

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Ubiquitina de Ceratitis Capitata : aislamiento, purificación y
caracterización**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rafael Pérez Castells

Madrid, 2015



TP
1983

126

53-098612-4

Rafael Pérez Castells

**UBIQUITINA DE CERATITIS CAPITATA:
AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION**

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 126/83

© Rafael Pérez Castells
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-14735-1983

AUTOR: RAFAEL PEREZ CASTELLS

UBIQUITINA DE CERATITIS CAPITATA: AISLAMIENTO,
PURIFICACION Y CARACTERIZACION.

DIRECTOR: Dr. D. Angel Martín Municio, Catedrático
de Química Fisiológica de la Facultad de
Ciencias de la Universidad Complutense.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Facultad de Ciencias Químicas.

Departamento de Bioquímica.

1.981

Este trabajo de investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección del Prof. D. Angel Martín Municio, a él y también muy especialmente a la Dra. Dña. Rosalía Rodríguez García deseo expresar mi agradecimiento por sus enseñanzas.

Asimismo, deseo agradecer la colaboración de mis compañeros de equipo, Dr. José Gavilanes Franco, Gonzalo González de Buitrago y Arriero, Renata Martín Doudignon, Alvaro Martínez del Pozo, Juan J. Manuel García y Jesús Fominaya.

Un recuerdo muy especial a Francisco Gavilanes Franco, con el que inicié este trabajo de investigación.

INDICE.

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	1
Estructura primaria	2
Proteína A24	4
Estructuras de orden superior	7
Función biológica	10
Diferenciación celular y activación de la adenilato ciclasa	11
Papel de la ubiquitina en cromatina	15
Mecanismo represor-desrepresor de la transcripción	16
Mecanismo de condensación de la cromatina	17
La proteína A24 a lo largo del ciclo celular	19
Mecanismo proteolítico	20
Biosíntesis de ubiquitina	21
MATERIALES Y METODOS	23
Material biológico	24
Determinación de actividad lítica	24
Valoración de proteínas	26
Aislamiento de la proteína	26
Extracción	26
Tratamiento térmico	27
Cromatografía en Amberlita CG-50	27
Cromatografía en Sephadex G-25 medium	30
Cromatografía en Sephadex G-75	31
Cromatografía en Sephadex G-50 en urea 6 M	32
Cromatografía en Amberlita CG-50	33
Comportamiento cromatográfico de la fracción que procede del Sephadex G-75	33
Criterios de pureza	35
Electroforésis en gel de poliacrilamida	35
Electroforesis en gradiente en disolución de ácido acético	36

	<u>Pág.</u>
Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS	37
Electroforesis en gradiente en presencia de SDS	38
Sistema de detección de bandas	38
Composición de aminoácidos	41
Determinación automática de la secuencia N-terminal	45
Conversión de ATZ-aa en PTH-aa	47
Identificación de las PTH-aa	48
Cromatografía gas-líquido	49
Cromatografía de PTH-aa en placa de sílica-gel	50
Cromatografía de PTH-aa en placa de poliamida	51
Hidrólisis de las PTH-aa	53
Hidrólisis enzimática	53
Digestión con tripsina	53
Digestión con quimotripsina	54
Hidrólisis con clostripaina	55
Separación de los péptidos	56
Separación en "fingerprint" en capa fina de celulosa	56
Extracción de los péptidos	57
Cromatografía y electroforesis en capa fina preparativa ..	58
Reactivos específicos para la detección de aminoácidos, pép- tidos y derivados	58
Detección con ninhidrina	59
Detección con fluorescamina	60
Reactivo específico para tirosina	62
Reactivo para arginina	63
Reactivo para triptófano	64
Reactivo para histidina y tirosina	64
Legradación manual	64

	Pág.
Combinación de la degradación manual de Edman y la reacción con cloruro de dansilo	65
Cromatografía de DNS-aa	68
Cromatografía de PTH-aa en placa de sílica-gel	71
Estructuras de orden superior	71
Espectro ultravioleta	71
Dicroísmo circular	72
RESULTADOS	73
Aislamiento de la fracción con actividad lítica	74
Comportamiento cromatográfico de la muestra que procede del Sephadex G-75	77
Cromatografía en Sephadex G-25 a distintos pH	77
Cromatografía en Sephadex G-50 en ácido acético	79
Aislamiento y purificación de ubiquitina de <i>Ceratitidis capi- tata</i>	81
Cromatografía en Sephadex G-50 en urea 6 M	81
Cromatografía en Amberlita CG-50	82
Criterios de pureza	83
Determinación del peso molecular de la ubiquitina	84
Análisis de aminoácido de la ubiquitina	85
Determinación del residuo N-terminal	88
Espectro ultravioleta de la ubiquitina	88
Espectro de dicroísmo	89
Determinación de la estructura primaria de la ubiquitina ..	91
Hidrólisis con tripsina	94
Análisis de aminoácidos de los péptidos trípticos	95
Rendimiento de la hidrólisis de la extracción	99
Determinación del N-terminal de los péptidos trípticos ...	102

	<u>Pág.</u>
Secuencia manual de los péptidos trípticos	103
Hidrólisis quimotríptica. Mapa peptídico	109
N-terminal de los péptidos quimotrípticos	112
Análisis de aminoácidos de los péptidos quimotrípticos ...	112
Rendimiento de la hidrólisis quimotríptica y de la extrac- ción de los péptidos	113
Hidrólisis con clostripaína. Mapa peptídico	114
Ordenación de los péptidos trípticos y quimotrípticos para la obtención de la secuencia completa de la ubiquitina de <i>Ceratitidis capitata</i>	115
Análisis de la fracción 2 de la cromatografía en Sepahdex G-50 en urea 6 M	120
Determinación del N-terminal	120
Separación en cromatografía preparativa en capa fina de los componentes de la fracción 2	122
Determinación del análisis de aminoácidos de los péptidos, A, B, C, D y E	124
Análisis de la fracción 3 del Sepahdex G-50 en urea 6 M ..	124
DISCUSION	126
Proceso de extracción	127
Análisis espectroscópico	128
• Hidrólisis enzimática	128
Homología interna	130
Conservatividad y velocidad de evolución	137
Péptidos contaminantes	138
Sistema de extracción a partir de mapas peptídicos	138
CONCLUSIONES	141
INSTRUMENTACION	144

	<u>Pág.</u>
PRODUCTOS	147
BIBLIOGRAFIA	153

INTRODUCCION.

INTRODUCCION.

La ubiquitina (Ub) o "polipéptido inmunopoyético omnipre_usente" (UBIP), es una proteína de bajo peso molecular (8.451 D), aislada por Goldstein en 1.974 al intentar purificar la timopoie_utina, una hormona polipeptídica del timo, de ternera.

Desde el año 1.974 se ha aislado esta proteína de distin_utas especies, tanto de mamíferos como de plantas (apio) y de tejidos diversos como cerebro, hígado, timo ... Inmunológicamente se ha detectado en vertebrados, invertebrados, plantas, hongos y bacterias. De estos estudios se ha concluido la presencia general de esta proteína en los diversos tipos de células tanto eucariontes como procariontes, y debe poseer, por tanto, una función básica a todas ellas.

La ubiquitina se ha aislado en dos formas, una libre, y otra, conjugada con la histona H2A como proteína A24 de cromati_una. En forma libre, aislada de cromatina, ha recibido el nombre de HMG-20, ya que se obtiene con este grupo de proteínas no his_utonas (Walker *et al.*, 1.978).

La función biológica específica de la ubiquitina es desconocida hasta la fecha, si bien existen múltiples datos que la implican en varios procesos:

- Activación de la adenilato ciclasa en gran variedad de tejidos, y diferenciación y maduración de células T y B.
- Mecanismos proteolíticos.

- Mecanismo de represión-desrepresión de la transcripción.
- Mecanismo de condensación de la cromatina.

La estructura primaria de esta proteína es conocida en tres especies, y es de destacar que en todos los casos la ordenación de los aminoácidos es la misma, poniendo de manifiesto un alto grado de conservación, superior aún al de las histonas. Probablemente estemos ante la proteína más conservativa de todas las detectadas hasta la fecha.

Se han realizado estudios físico-químicos en orden a la determinación de su pI, espectros ultravioleta y visible, de dícroísmo circular y resonancia magnética nuclear; se ha estudiado el entorno de su única tirosina. Recientemente ha sido cristalizada (Cook *et al.*, 1.979).

Estructura primaria.

Las ubiquitinas secuenciadas, de timo de ternera (Low *et al.*, 1.979 y Schlesinger *et al.*, 1.975), humana (Schlesinger *et al.*, 1.975b), de testículo de trucha (Watson *et al.*, 1.978), tienen la misma estructura primaria. Únicamente pueden presentarse diferencias en los residuos 68-71 de la secuencia de ubiquitina de cromatina de testículo de trucha, ya que el péptido triptico que compone la secuencia 68-72 no ha sido ordenado. En esta misma secuencia aparece heterogeneidad en el residuo C-terminar, en el que se ha detectado glicocola en el 50% de las moléculas. Este residuo de glicocola puede ser resto del dipéptido Gly-Gly que forma el puente entre la ubiquitina y la histona H2A

en la proteína A24.

Hay varias regiones en la estructura primaria de la ubiquitina que presentan homología entre sí. Esto sugiere una duplicación de un gen ancestral que dió origen al gen de la ubiquitina. Las inmunoglobulinas son un buen ejemplo de las ventajas selectivas en vertebrados de este mecanismo evolutivo. Si la hipótesis de la duplicación de un gen ancestral es correcta, la ubiquitina debió aparecer en un estado muy primitivo de la evolución celular y tuvo ventajas suficientes para que las células que poseyeran esta proteína excluyeran del proceso evolutivo a las que no la poseían (Schlesinger *et al.*, 1.975).

La velocidad de evolución molecular se puede medir en función del número de residuos que cambian en la secuencia de una proteína en distintas especies. La velocidad de evolución mas baja, hasta ahora encontrada, es la de la histona H4 que tiene dos sustituciones en 102 residuos entre la histona aislada de ternera y la de guisante (Delange *et al.*, 1.969). Otra proteína con un cambio relativamente lento es el citocromo c, con 10 sustituciones en 112 residuos entre citocromo c bovino y humano (Dayhoff, 1.972).

La invariabilidad en la secuencia de esta proteína en las especies estudiadas, permite suponer que es, al menos, una de las de más lenta evolución hasta ahora secuenciadas. La gran conservación de la estructura primaria en la que ni siquiera se intercambian aminoácidos conservativos entre sí, hace pensar que cualquier cambio alteraría la funcionalidad de esta proteína de forma irreversible, y que las estructuras de orden superior son fundamentales en su función. Comparativamente, la importancia de la

ubiquitina en la cromatina debe ser similar a la de las histonas ricas en arginina (H3 y H4), que hasta ahora tienen una conservación en su estructura menor que la ubiquitina, pero aún muy alta.

Usando los datos para predicción de la conformación de una proteína, conocida su estructura primaria (Chou y Fasman, 1.974), los 15 residuos N-terminales están en estructura β y el extremo C-terminal (residuos 62-74) en hélice α ; estos resultados dan un 20% de estructura β , 17% de hélice α y 63% de cadena estadística. Resultados éstos, que no concuerdan con los obtenidos por dicroísmo circular (Jenson *et al.*, 1.980).

Se ha descrito que la ubiquitina es resistente a la hidrólisis enzimática con tripsina, quimotripsina, subtilisina y carboxipeptidasas, y que para su hidrólisis es necesario alterar su estructura por modificación química (Schlesinger *et al.*, 1.975). No obstante, otros autores, describen que la ubiquitina nativa se hidroliza en un 75% con tripsina o quimotripsina (Low *et al.*, 1.979). La protección de la proteína a la hidrólisis enzimática, estaría en función de su purificación, ya que la ubiquitina puede interaccionar con péptidos de bajo peso molecular que la protegen. La ubiquitina separada de estos péptidos en cromatografía de penetrabilidad en cloruro de guanidinio 6M, Tris-HCl pH 7,5, es accesible a la hidrólisis enzimática.

Proteína A24.

Se ha descrito que la secuencia de los 37 primeros residuos de la región N-terminal de la proteína A24 es idéntica a la de la ubiquitina (Hunt *et al.*, 1.977).

La proteína A24 se encuentra en la cromatina y estructu-

ralmente está formada por, al menos, dos fragmentos polipeptídicos. Uno de ellos es la histona H2A y el otro una proteína no histona. La probabilidad de que el gen que ha producido la ubiquitina sea distinto del que ha producido la secuencia N-terminal descrita por Hunt es menor de 10^{-37} según el método de Dayhoff (1.976). La ubiquitina por lo tanto, debe ser un producto de degradación de la proteína no histona que forma parte de la proteína A24.

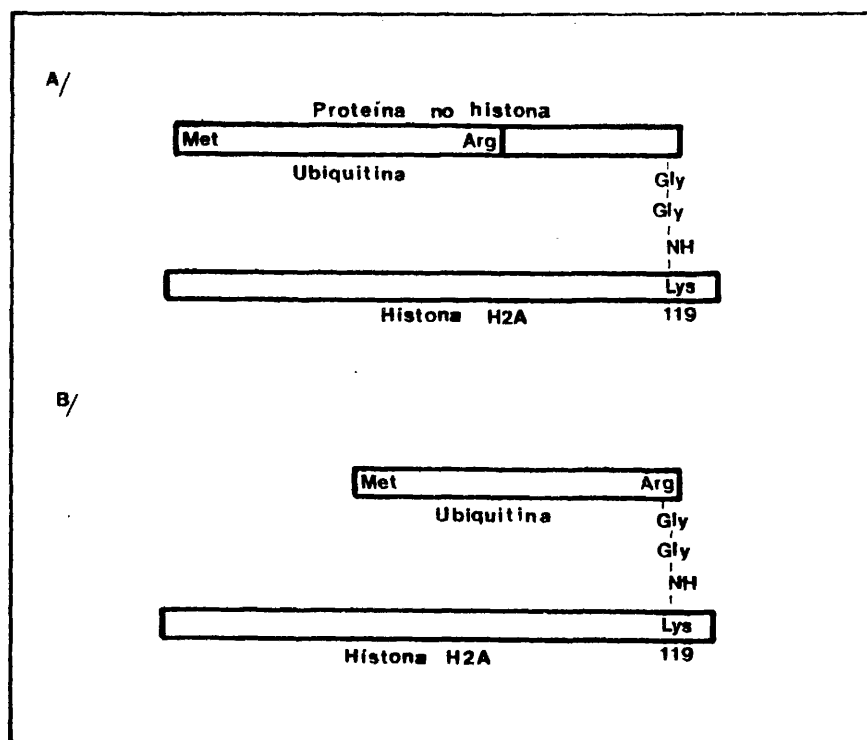


FIGURA 1: Esquemas de la proteína A24.

A/ Modelo propuesto por Hunt *et al.*, 1.977.

B/ Modelo basado en los postulados de Matsui *et al.*, 1.979.

Esta proteína tiene un peso molecular de 27.000 D (humana y bovina). La ubiquitina tiene un peso molecular de 8.451 D y la histona H2A de 14.000 D. La diferencia de 4.500 D entre H2A-Ub y A24 indican que hay un componente no histónico con este peso molecular, que forma parte de la proteína A24 (Hunt *et al.*, 1.977). Por diferencia entre el análisis de aminoácidos de A24 y H2A-Ub, este péptido tendría 37 residuos.

Por otro lado con la proteína aislada de hamster chino, se ha encontrado un peso molecular de 22.500 D, que no hace necesario la presencia del tercer componente peptídico (Matsui *et al.*, 1.979).

Se ha aislado el péptido que contiene el enlace isopeptídico entre la ubiquitina y la histona H2A. El enlace se realiza entre un dipéptido de glicocola, que se encuentra unido a la ubiquitina por su región C-terminal y el ϵ -NH₂ de la lisina 119 de la histona H2A (Goldknopf y Buch, 1.977).

Se ha atribuido la diferencia entre el peso molecular de A24 y H2A-Ub a una migración anormal de la proteína A24 en electroforésis en poliacrilamida en presencia de SDS, debido a que tanto la histona H2A como la ubiquitina tienen regiones muy hidrofóbicas que pueden unir detergente en exceso (Watson *et al.*, 1.978). En la figura 1 aparecen las dos posibles estructuras postuladas para la proteína A24.

La ubiquitina se ha aislado de fracciones no nucleares, mientras que la proteína A24, se encuentra en la cromatina nuclear y nucleolar. Es posible que la ubiquitina no nuclear sea un producto de degradación de la región no histónica de la proteína A24. Se ha postulado la existencia de una arginin-esterasa

que hidroliza el enlace entre la arginina C-terminal de la ubiquitina y el tercer componente de la proteína A24 (Hunt *et al.*, 1.977). Recientemente ha sido detectada la actividad de una enzima que libera a la ubiquitina de la proteína A24 (Andersen *et al.*, 1.981). Una vez producida su liberación, difunde del núcleo al citoplasma. La función citoplasmática no está todavía determinada, pero en el núcleo puede estar implicada en el mecanismo de represión-desrepresión de la transcripción del DNA y en el mecanismo de condensación de la cromatina en la mitosis.

Por otro lado los mismos autores proponen el desdoblamiento del gen de la ubiquitina; cada uno de los nuevos genes estaría encargado de producir una ubiquitina estructuralmente idéntica, pero con funciones distintas, una nuclear y otra no nuclear, que naturalmente han tenido el mismo camino evolutivo. Este mecanismo no ha sido observado en otras proteínas.

La ubiquitina no se conjuga únicamente con la histona H2A, se ha descrito la unión de esta proteína con la histona H2B (West *et al.*, 1.980). Pero, mientras que la histona H2A se conjuga en un 10-11%, la histona H2B lo hace en un 1-1,5%. La unión de la histona H2B a la ubiquitina se realiza por el extremo C-terminal de la primera, como se deduce del estudio electroforético de los péptidos de bromuro de cianógeno de la proteína A24.

Estructuras de orden superior.

La estructura de la ubiquitina se caracteriza por ser poco ordenada. En estudios de predicción de estructura secundaria, ya hemos visto que la proporción de hélice α y estructura β suponen el 37% de los residuos. En estudios de dicroísmo circular

en el ultravioleta lejano (Jensen *et al.*, 1.980), estas proporciones son sustancialmente menores, con un 6% de los residuos en hélice α , el 10% en estructura β , y el 84% en cadena estadística. A pesar, sin embargo de este escaso ordenamiento, se trata de una proteína con una estructura tridimensional muy estable.

La variación del pH entre 3 y 12, no produce cambios en el espectro de dicroísmo. El espectro de resonancia magnética nuclear se mantiene casi sin alteraciones con el cambio del pH; sin embargo se observan cambios a 1,0-3,0 ppm del espectro, que son causados por la ionización de los ácidos aspártico y glutámico (Lenkinski *et al.*, 1.977).

Como se puede deducir del proceso de aislamiento, de esta proteína, la estabilidad frente a la temperatura es grande. Resultados que se ven confirmados por resonancia magnética nuclear, cuyos espectros prueban la no existencia de desnaturalización entre 23°C y 80°C.

Las variaciones de fuerza iónica producen un cambio conformacional, detectado por CD en el ultravioleta lejano, a una fuerza iónica de 0,16 (Jensen *et al.*, 1.980). Por NMR se detecta desnaturalización total en presencia de cloruro de guanidinio 7M, aunque presenta gran estabilidad a concentraciones menores (Lenkinski *et al.*, 1.977).

La asignación de bandas en la región aromática del espectro de NMR ha sido relativamente sencilla, ya que la proteína posee una sola histidina (residuo 68), una tirosina (residuo 59) y dos fenilalaninas (residuos 4 y 45). Presenta dos singletes a 6,8 ppm y 7,5 ppm correspondientes a los hidrógenos C2 y C4 de la histidina. Los dobletes AB a 6,9 y 7,2 ppm son debidos a la tirosina y la resonancia remanente a 7,0, 7,2 y 7,6 ppm es pro-

ducida por los protones de la fenilalanina. La histidina tiene un cambio en el pH, con pK_a alrededor de 6,7.

El espectro ultravioleta está de acuerdo con la existencia de tirosina en la molécula; a pH 7,6 este espectro tiene un máximo a 278 nm y 5 hombros a 253, 259, 261, 271 y 282 nm; al pasar a pH 13, el espectro exhibe un máximo a 296 nm característico del ión tirosinato. La valoración espectrofotométrica de la tirosina proporciona un valor de pK_a de 11,1, valor un tanto elevado para este residuo. El entorno anormal de la tirosina se pone de manifiesto por espectroscopía de fluorescencia (Jensen *et al.*, 1.980). El máximo de emisión está a 303 nm, y la relación de rendimientos cuánticos ubiquitina/tirosina libre a pH 7 es menor de 0,07 valor anormalmente bajo. Si cambia el pH de 7 a 2, se produce un aumento de 400% en la fluorescencia de la ubiquitina. A pH 7, y en cloruro de guanidinio 7M, la fluorescencia aumenta el 150%. En general, en presencia de agentes desnaturantes, la variación del pH no afecta a los valores anteriores.

El extraño comportamiento de la tirosina, se atribuye a la presencia en el entorno de uno o varios grupos carboxilo. La tirosina sufre "quenching" por estos grupos que tienen un pK_a de 3,9 medido por titulación fluorimétrica. Esta es la causa del aumento de fluorescencia cuando el carboxilo o carboxilos se protonan. El "quenching" podría estar causado por un cambio conformacional al descender el pH, pero esta posibilidad queda descartada al no ponerse de manifiesto por dicroísmo circular. El grupo carboxilo que interacciona con la tirosina, probablemente no es el del ácido aspártico contiguo (residuo 58), ya que en presencia de agentes desnaturantes, la interacción es independiente del pH.

Se han estudiado por dicroísmo circular las interacciones entre la ubiquitina y la histona H2A. La unión de estas dos proteínas no altera el espectro de cada una de ellas, por lo que no deben producirse cambios conformacionales. Tampoco parece haber interacción entre el DNA y la ubiquitina. Esta debe interactuar con otro componente de la cromatina, como las histonas H2A y H2B y servir de impedimento estérico que bloquea una región del nucleosoma.

Se ha logrado cristalizar esta proteína y realizar los primeros estudios de difracción de rayos X. Los cristales de ubiquitina son orto-rómbicos, del grupo $P2_12_12_1$, con unas dimensiones $a=50,9 \text{ \AA}$ $b= 42,9 \text{ \AA}$ y $c= 29,0 \text{ \AA}$. Los cristales son estables a temperatura ambiente y difractan fuertemente con $1,7 \text{ \AA}$ de resolución. Asignando un peso molecular de 8.451 D y un volumen específico parcial de $0,74 \text{ cm}^3/\text{g}$, el volumen molecular es de $1,87 \text{ \AA}^3/\text{D}$, con el 34% de este volumen ocupado por moléculas de disolvente. En la actualidad, los mismos autores, están intentando obtener derivados isomórficos con átomos pesados para la consecución de mapas electrónicos.

Función biológica.

La función biológica exacta de esta molécula no está todavía determinada. Si bien se la implica en la diferenciación de células B y T *in vitro*, no se cree que posea esta función *in vivo*. Se ha descrito que la ubiquitina actúa como activador de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de c-AMP en el citoplasma. Esta acción es inhibida totalmente por propranolol, lo que indica que la acción de la ubiquitina tendría lugar vía re-

ceptores β -adrenérgicos.

Todas estas funciones se han puesto en duda recientemente, pues los estudios realizados por el grupo de G. Goldstein del Sloan-Kettering Institute for Cancer Research de Nueva York, son contradictorios con los publicados por A.L. Goldstein y T.L.K. Low de la Universidad de Texas (Galveston), como se discutirá más adelante.

Se ha identificado la ubiquitina en forma libre y conjugada en la cromatina (Goldknopf *et al.*, 1.975 y Watson *et al.*, 1.978). La forma libre está localizada en las zonas de cromatina enriquecidas en secuencias de DNA que pueden transcribirse a RNA. La concentración de ubiquitina libre aumenta durante la actividad del gen, mientras que la proteína A24 desaparece.

El último mecanismo en la que parece estar implicada la ubiquitina, está relacionado con la proteólisis dependiente de ATP en reticulocitos de conejo (Ciechanover *et al.*, 1.980).

Diferenciación celular y activación de la adenilato ciclasa.

Desde que en 1.961 Miller, y Acher y Pierce, describen que la timotectomía prenatal en ratón y conejo produce el fallo en el crecimiento postnatal normal y en el desarrollo y maduración del tejido linfático, se puso de manifiesto la importancia de las hormonas tímicas en la maduración, proliferación y competencia inmunológica de los linfocitos.

No se conoce todavía como se ejerce el control sobre las células T (linfocitos timo-dependientes) por el timo, pero parte del proceso ocurre vía hormonal. Se han aislado una serie de péptidos tímicos que podrían tener relación con este mecanismo, en-

tre estos péptidos tenemos la timopoiatina (Tp aislada de timo bovino conjuntamente con la ubiquitina (Ub), y que posee un peso molecular de 5.562 D (Goldstein, 1.974); la ubiquitina y el factor tímico sérico (FTS) que es un nonapéptido de peso molecular cercano a los 900 D (Bach *et al.*, 1.977a, 1.977b, 1.977c).

En experimentos *in vitro*, se ha demostrado la capacidad de la ubiquitina y de la timopoiatina de inducir la aparición de receptores de superficie en granulocitos, células T y B. Hecho que pone de manifiesto la función, que en el proceso de maduración de estas células, tienen los dos polipéptidos. Así, la ubiquitina es capaz de inducir en los granulocitos el receptor de superficie C3d, y de conferir a éstos la capacidad de respuesta a agentes quimiotácticos, y de fagocitar partículas de latex (Kagan *et al.*, 1.977).

PEPTIDO	CELULA	RECEPTOR	AUTOR
Tp	Células-T	Thy-1, TL, Ly 1, 2, 3. SBRC.	Scheid <i>et al.</i> , 1.975. Kagan <i>et al.</i> , 1.979.
	Células-B	MRBC Ia	Kagan <i>et al.</i> , 1.979. Hammerling <i>et al.</i> , 1.975.
Ub	Granulocitos	C3d	Kagan <i>et al.</i> , 1.977.
	Células-T	Fc, HTLA, SBRC.	Kagan <i>et al.</i> , 1.979.
	Células-B	Fc, MBRC, IgM	Kagan <i>et al.</i> , 1.979.

TABLA 1: Receptores inducidos por ubiquitina y timopoiatina.

En la tabla 1, se recogen los diferentes receptores, cuya aparición es inducida por la ubiquitina y la timopoietina. Y en la figura 2, aparece un esquema del proceso de diferenciación de las células B y T. En dicho esquema, se puede observar que ambas células derivan de un tronco hematopoiético común, y que hay algunos receptores como IgA, de los que no se conoce el momento de su aparición, o células en las que aparecen marcadores que lo hacen tanto en las células T como en las B (SRBC y C), de las que no se conoce su relación con el tronco común.

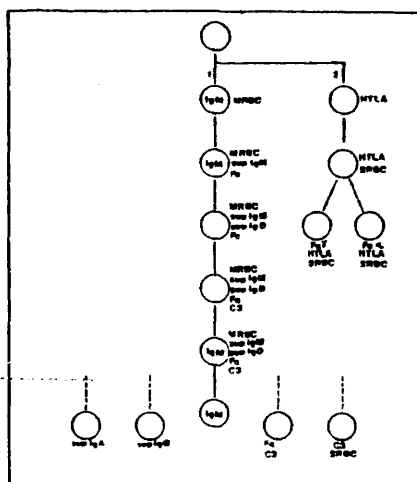


FIGURA 2: Esquema hipotético del proceso de diferenciación de células T y B. Aparición de marcadores de superficie.
MRBC marcadores de eritrocito de rata.
SRBC marcadores de eritrocito de oveja.
HTLA heteroantígeno HTLA.
(1) células B (2) células T.

Hay receptores como el aloantígeno TL, que aparece en el estado protimocito, y desaparece cuando éste se transforma en linfocito T, cuya expresión en la superficie celular es un proceso intermitente a lo largo de la hematopoiésis.

Se ha demostrado que la diferenciación de las células B, en las primeras etapas se realiza mediante un segundo mensajero, que se manifiesta en las elevaciones de los niveles de c-AMP. La

diferenciación final, se produce a través de la elevación del nivel intracelular de c-GMP.

Siempre que se estudia la función inductora de la ubiquitina en la diferenciación de marcadores de superficie, se relaciona a esta proteína con la timopoiatina y el factor tímico sérico, por poseer, en principio, funcionalidades semejantes, aunque no independientes entre sí. Los receptores de timopoiatina y ubiquitina son diferentes, ya que la segunda ve impedida su acción por bloqueadores β -adrenérgicos y la primera no. La función, en la diferenciación de marcadores de eritrocito de oveja (SBRC), del FTS se ve inhibida por la ubiquitina, mientras que la acción de la Tp sufre un efecto sinérgico por la misma proteína (Iwata *et al.*, 1.979). A su vez el FTS y la Tp pueden estar *in vivo* formando una única hormona que tiene la funcionalidad de las dos cadenas polipeptídicas (Folkers *et al.*, 1.979).

Otro resultado que apoya la hipótesis de un papel en la diferenciación celular de la ubiquitina, es la síntesis del hexapéptido 59-74 de la ubiquitina -péptido que contiene la tirosina 59 de la proteína- y el análisis de su funcionalidad biológica (Schlesinger *et al.*, 1.978).

El péptido 59-74 posee aproximadamente el 40% de la actividad inductora de timocitos, células B y elevación intracelular del nivel de c-AMP, que posee la ubiquitina nativa. La secuencia de este péptido está implicada en la actividad descrita para la ubiquitina, y el centro activo epinefrín-mimético de la proteína debe estar presente en él. Por lo tanto, la estructura terciaria de la ubiquitina no debe influir en la actividad biológica del ensayo. Teniendo en cuenta la conservatividad de esta proteína,

la permanencia de los aminoácidos a lo largo de la evolución, no debe estar relacionada con la formación del centro activo que es capaz de elevar los niveles intracelulares de c-AMP. La conservatividad debe estar relacionada con otras funciones de la ubiquitina, en la cromatina o en mecanismos proteolíticos.

La actividad *in vivo* de la ubiquitina (UBIP o HMG-20) no ha sido detectada. Así, en los ensayos realizados sobre ratón, se pone de manifiesto la incapacidad de la Ub, Tp, FTS para restaurar la inmunocompetencia dependiente de timo en ratones timectomizados (Martínez *et al.*, 1.978).

En 1.979, T.L. Low y A.L. Goldstein, aislando los péptidos de timo resistentes al tratamiento térmico, obtienen un péptido β_1 que posee la estructura primaria de la ubiquitina. Sin embargo, este polipéptido no exhibe actividad alguna frente a la elevación de los niveles de c-AMP, la estimulación de la diferenciación de células T y B, la estimulación de marcadores Lyt, etc. Es posible que la causa de esta discrepancia sea la aducida por estos autores, de que sus preparaciones de ubiquitina están libres de contaminación por endotoxinas, activadoras de adenilato ciclasa (Naylor *et al.*, 1.978), mientras que las preparaciones obtenidas por el método de G. Goldstein poseerían esta contaminación.

Papel de la ubiquitina en cromatina.

La presencia de ubiquitina libre o conjugada con la histona H2A en la cromatina, ha sido relacionada con los mecanismos de represión-desrepresión de la transcripción del DNA, y de condensación de la cromatina en la metafase.

Mecanismo represor-desrepresor de la transcripción.

Una serie de indicios experimentales, implican a la ubiquitina libre y a la proteína A24 en este mecanismo. Realmente no se conoce todavía si estas dos proteínas están implicadas directamente en los procesos de inducción o represión de la transcripción, pero se ha postulado que la desconjugación de la proteína A24 lleva a la cromatina a un estado intermedio en el que no está activa, ni reprimida, pero potencialmente activa. Por lo tanto, para pasar de cromatina transcribiente a cromatina inactiva, habría un estado de transición que se alcanzaría por el equilibrio conjugación-desconjugación de la proteína A24 (Goldknopf *et al.*, 1.980).

En eritrocitos policromáticos tempranos, medios y tardíos de pollo, en los que no hay replicación, pero sí transcripción y traducción, los niveles de proteína A24 disminuyen hasta su desaparición, mientras que en eritrocitos maduros, que ni transcriben ni traducen, pero sintetizan DNA, los niveles de A24 se mantienen normales (Goldknopf *et al.*, 1.980).

Por otro lado, durante la síntesis de rRNA por cromatina de nucleolo de hígado de rata, hiperinducida con tioacetamida (Ballal *et al.*, 1.974a) o por hepatectomía (Ballal *et al.*, 1.974b), la concentración de proteína A24 disminuye en gran medida.

Estos dos resultados en los que se observa una desaparición de la proteína A24 durante la transcripción del DNA, concuerdan con la aparición de ubiquitina libre, acompañando a fragmentos de DNA transcribientes, cuando se trata la cromatina, en condiciones en las que se libera el DNA que se encuentra entre los nucleosomas, con nucleasa de micrococo. Acompañan a la ubiquitina, la proteína no histona HMG-T y H6 que parecen formar parte del mismo mecanismo.

Los resultados no son terminantes, pero la proteína A24 podría ejercer directamente su acción sobre el DNA, o por medio de alguno de sus fragmentos, como por ejemplo, la ubiquitina (Goldknopf *et al.*, 1.978).

Mecanismo de condensación de la cromatina.

En la búsqueda de alguna diferencia en la composición en proteínas de la cromatina en la interfase y metafase, y en investigaciones encaminadas a encontrar las bases moleculares de la condensación de la cromatina en la mitosis, se ha encontrado que la única diferencia estriba en la desaparición de la proteína A24 y la aparición de ubiquitina libre durante la mitosis (Matsui *et al.*, 1.979). Se descarta la liberación al citoplasma de esta proteína, pues no ha sido detectada en él, y se supone que la proteína A24 se descompone en histona H2A y ubiquitina. Esta hipótesis concuerda con que durante la mitosis la histona H2A aumenta su concentración en un 8%, que es el porcentaje de histona unida a la ubiquitina durante la interfase. En la figura 3 aparece un esquema de este mecanismo.

Los nucleosomas, en la cromatina, adoptan una estructura superenrollada en fibras de 250 Å de diámetro. En el 8-10% de los nucleosomas, se encuentra expuesto el extremo C-terminal de la histona H2A, que contiene grupos cargados positivamente (ϵ -NH₂ e imidazol).

En la interfase, la ubiquitina puede bloquear las interacciones iónicas de los extremos C-terminales, expuestos, de la histona H2A. Al liberarse la ubiquitina en la metafase, se da la posibilidad de formar enlaces iónicos entre el extremo positivo de la

histona H2A y otros puntos cargados negativamente en una fibra adyacente.

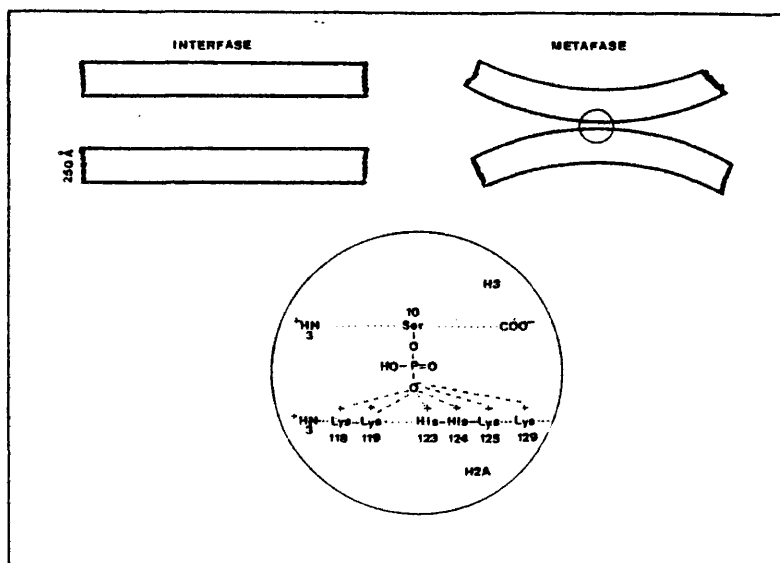


FIGURA 3: Esquema del mecanismo de condensación de la cromatina.

Las zonas cargadas negativamente, podrían corresponder a las regiones N-terminales de las histonas H1 y H3 que se fosforilan en la mitosis. Este modelo concuerda con los resultados del estudio de las interacciones entre Ub y H2A. Ninguna de las dos proteínas sufren alteraciones en su conformación, cuando se unen formando la proteína A24, por lo tanto la única interacción posilble, es estérica, en la que se impide el acceso a los grupos cargados positivamente de la histona H2A.

La proteína A24 a lo largo del ciclo celular.

La proteína A24 parece ser estable durante toda la interfase, ya que aparecen modificaciones postsintéticas (fosforilaciones de treonina y serina, ϵ -N-acetilación y ADP-ribosilación), que son características de las fases en las que hay reparación del DNA, replicación y deposición de histonas, y que tienen lugar a lo largo de la interfase.

El hecho de que se puedan detectar modificaciones de la proteína A24, y que éstas ocurran durante la interfase, no permite descartar que la conjugación de la ubiquitina con la histona H2A, sea un proceso dinámico a lo largo de esta fase de la vida celular.

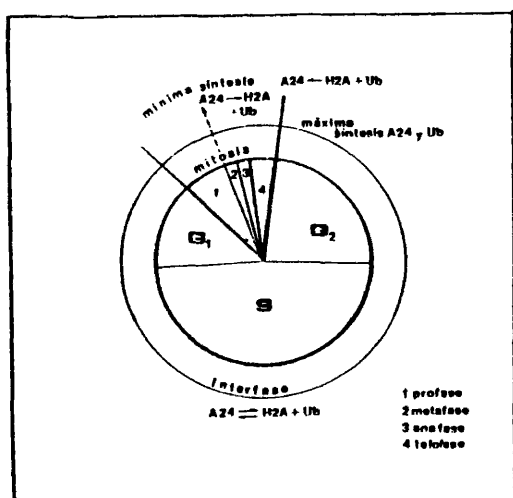


FIGURA 4: La proteína A24 a lo largo del ciclo celular.

La proteína A24 se modifica únicamente en la fracción histona, de la misma forma que lo hace la histona H2A libre. La ubiquitina no sufre modificaciones, a diferencia de las proteínas no

histona que se pueden aislar junto a ésta, sin embargo, mientras que las HMG interaccionan directamente con el DNA, la ubiquitina sólo lo hace a través de la fracción histona de la proteína A24 (Goldknopf *et al.*, 1.979).

Por lo tanto, durante la interfase existiría un mecanismo dinámico de conjugación-desconjugación de Ub y H2A, que estaría implicado en la transcripción del DNA. Al pasar a la metafase, una arginin-esterasa liberaría la ubiquitina (Andersen *et al.*, 1.980) permitiendo las interacciones iónicas que darían lugar a la formación del centrómero. Al acabar la mitosis, otra enzima condensaría de nuevo la Ub y la H2A impidiendo estas interacciones y entrando en la interfase.

La biosíntesis de la ubiquitina es independiente del proceso de conjugación y paralelo a él. Ocurre durante la interfase, con un máximo en la fase G1 temprana, y un mínimo en la división celular, acompañado de un máximo en la desconjugación de la proteína A24.

Mecanismo proteolítico.

En el estudio de un mecanismo proteolítico dependiente de ATP en reticulocitos de conejo, se ha observado que el sistema proteolítico está formado por varios componentes. Se ha aislado e identificado el componente, inicialmente denominado APF-1, como ubiquitina.

La ubiquitina no tiene acción proteolítica en sí, pero su-
mada a fracciones aisladas de reticulocito de conejo que contienen
otros componentes del sistema y al ATP, estimula la proteólisis.
En este mecanismo, una o más moléculas de ubiquitina, se unen a

una molécula de sustrato. Las enzimas proteolíticas reconocen este oligómero, y lo hidrolizan sin afectar a la ubiquitina. El reconocimiento y unión de la ubiquitina a las proteínas que van a hidrolizarse, puede ser similar al efectuado sobre la histona H2A en la formación de la proteína A24. (Ciechanover *et al.*, 1.980).

Biosíntesis de ubiquitina.

La localización de las glándulas que sintetizan ubiquitina, ha sido siempre consecuencia indirecta en los estudios de biosíntesis de diversas hormonas.

Se ha detectado biosíntesis de ubiquitina en cerebro de rata, tumores de pituitaria en hombre y rata (Scherrer *et al.*, 1.978), — glándula paratiroidea (Hamilton *et al.*, 1.980) y en glándulas de pituitaria de vaca (Seidah *et al.*, 1.978). En todos los casos la velocidad de biosíntesis de la ubiquitina, medida en función de la incorporación de aminoácidos marcados, es de las más elevadas de todas las de los péptidos y proteínas sintetizados por estas glándulas. Debido al comportamiento anormal de esta proteína en electroforésis en SDS, se atribuyó al producto de biosíntesis un tamaño molecular de 4.000 D, y se pensó que se detectaba un fragmento de la ubiquitina, y no la ubiquitina completa.

* * *

En el proceso de aislamiento de la lisozima de *Ceratitis capitata* fue detectado un contaminante de bajo peso molecular, que provocaba un comportamiento anómalo en la fracción con actividad lítica.

En un principio se pensó en caracterizar este polipéptido debido a la gran cantidad detectada, por electroforesis SDS, en el primer paso de aislamiento. El conocimiento de que el polipéptido era Ubiquitina -proteína de gran distribución en el mundo celular, y de funciones biológicas variadas y muy interesantes, aunque casi ninguna verificada de forma completa- indujo a un estudio más profundo sobre su estructura.

El objetivo de la investigación fue, por lo tanto, el adecuar el proceso de aislamiento para la obtención de máximos rendimientos de ubiquitina, la obtención de la estructura primaria del polipéptido y su estudio espectroscópico.

Con la consecución de la estructura primaria se pretende por un lado, poner a punto técnicas nuevas en secuencia y aislamiento de péptidos, en consonancia con los trabajos de secuencia iniciados en este laboratorio (Pérez-Aranda A., 1.973), y por otro la comparación de la estructura primaria de la primera ubiquitina de insecto secuenciada con las otras secuencias publicadas.

La obtención de espectros ultravioleta y de dicroísmo circular, tiene importancia a nivel comparativo con los obtenidos por otros autores (Jensen *et al.*, 1.980 y Cary *et al.*, 1.980), y en función de clarificar la estructura secundaria de esta protefna.

23

MATERIALES Y METODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utiliza el huevo del díptero *Ceratitis capitata* que se cultiva en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (El Encín, Alcalá de Henares), en las condiciones descritas por Fernandez Sousa *et al.*, (1.971). Los huevos se recogen durante las 24 horas siguientes a la puesta y se congelan inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido, almacenándose a -30°C hasta su utilización.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD LÍTICA.

Se realiza mediante la medida de la velocidad de clarificación de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus*. La enzima hidroliza las paredes bacterianas, de forma que los productos de la lisis son más solubles en el medio acuoso y en consecuencia la turbidez de la suspensión decrece.

Sustrato :

Se prepara una suspensión de células de *M. Lysodeikticus* en tampón fosfato potásico 0,066 M, pH 6,24. Su absorción debe estar comprendida entre 0,6 y 0,7 unidades de densidad óptica a 450 nm.

Procedimiento :

- A 2,5 ml de la disolución anterior, colocados en la cubeta del espectrofotómetro, se añaden 0,1 ml de la solución de lisozima.

- Previa mezcla por inversión de la cubeta, se lee el descenso de densidad óptica a 450 nm.
- Los cambios de absorción han de medirse en los primeros minutos de la reacción, ya que los productos de hidrólisis inhiben la acción lítica.
- En todos los casos las variaciones de absorbancia a 450 nm se siguen en un espectrofotómetro Varian Techtron modelo 635 D, equipado con un registro gráfico Radiometer Servo grahp. Las cubetas utilizadas en todas las medidas son de 1 cm de paso óptico. El ensayo se realiza a 25°C.

Unidad de actividad enzimática.

Se define como unidad de actividad lítica al descenso de 0,001 unidades de absorción producido por una cantidad de enzima a 450 nm., utilizando las condiciones de ensayo anteriormente descritas.

El cálculo de unidades se realiza mediante la expresión.

$$u. = \frac{\Delta DO_{450}}{0,001 \cdot v}$$

siendo

u. = unidades por ml de muestra.

ΔDO_{450} = variación en la absorción a 450 nm durante 1 minuto.

v = volumen ensayado de la disolución de la enzima.

En nuestro caso v = 0,1 ml.

VALORACION DE PROTEINAS.

La determinación de la concentración de proteína se realiza según el método descrito por Lowry *et al.* en 1.951.

En preparaciones puras de UBIP, la determinación de la concentración se realiza mediante el empleo del coeficiente de extinción molar a 275 nm, según la expresión :

$$A_{275} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

siendo

A_{275} = absorción de la muestra a 275 nm.

l = paso óptico en cm.

c = concentración molar de la muestra.

ϵ = coeficiente de extinción molar a 275 nm, con un valor de $1.750 \text{ a.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Jenson, J. *et al.*, 1.980).

Las medidas de absorción se realizan en un espectrofotómetro Varian, con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

AISLAMIENTO DE LA PROTEINA.

La ubiquitina de huevo de *Ceratitidis capitata* se aisló inicialmente como contaminación de la lisozima, siguiendo el método descrito por Fernández Sousa *et al.*, (1.977). Posteriormente, este método se modificó para optimizar los rendimientos de ubiquitina.

Extracción.

En un homogeneizador de teflón-vidrio se tratan lotes de

200 g de huevo de *Ceratitis capitata* en 200 ml de ácido acético 0,1 M, conteniendo 50 µg/ml de cloranfenicol. Se añaden 400 ml más de ácido acético 0,1 M y se mantiene agitando sobre placa magnética durante 90 minutos a 4°C. El homogeneizado se centrifuga a 27.000 g (15.000 rpm en rotor SS-34) durante 30 minutos a 4°C. El residuo se extrae en las mismas condiciones anteriores, pero añadiendo únicamente 200 ml de ácido acético 0,1 M antes de los 90 minutos de agitación. La suspensión se centrifuga a 15.000 rpm (rotor SS-34) durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante se une al obtenido anteriormente y preva filtración por papel Whatman n° 1, se somete a la etapa siguiente.

Tratamiento térmico.

El conjunto de sobrenadantes obtenidos en la etapa anterior se lleva a fuerza iónica 0,1 M con fosfato potásico, se calienta en baño de agua a 65°C durante 5 minutos y se enfría, a continuación, entre 2° y 4°C en baño de hielo. Después de 2 horas en estas condiciones, las proteínas precipitadas se separan por centrifugación a 27.000 g durante 15 minutos a 4°C.

Cromatografía en Amberlita CG-50.

Preparación de la resina :

Amberlita CG-50, (200-400 mesh) se pasa sucesivamente a través de sus formas Na^+ y H^+ utilizando dos tratamientos con 8 volúmenes de NaOH 2N, seguidos con 5 lavados

con agua desionizada. El sobrenadante se decanta después de cada lavado, una vez que la mayor parte de la resina haya sedimentado, para eliminar las partículas finas que acompañan al material comercial. El ciclo se repite una vez más, lavándose entonces la resina, que se encuentra en forma H^+ , 5 veces con 8 volúmenes de acetona. La acetona se elimina completamente con 15 lavados de agua desionizada. El proceso se repite 2 veces más hasta este punto, llevándose entonces la resina a la forma Na^+ . Después de 5 lavados con agua desionizada, la resina se equilibra cuidadosamente a pH 6,7-7,0 con H_3PO_4 5 N. El equilibrio requiere normalmente entre 5 y 6 horas de agitación vigorosa. La resina equilibrada se lava 2 veces con agua desionizada y se suspende en 2 volúmenes de tampón fosfato potásico 0,1 M pH 6,7. Si transcurridas varias horas el pH de la suspensión es superior a 7,0 debe repetirse el equilibrio. La resina puede guardarse en este tampón a 4°C.

Absorción y elución de la ubiquitina.

Unos 40 ml de Amberlita CG-50, equilibrada en tampón fosfato potásico 0,1 M pH 6,7, se mantienen agitando a 4°C durante toda una noche con los sobrenadantes claros procedentes de la etapa anterior. La resina con la proteína unida se carga en una columna de 2,6 cm de diámetro. Se lava con agua destilada y posteriormente con el mismo tampón de equilibrio hasta que el eluido, registrado a

280 nm en un fotómetro de flujo continuo Uvicord II, no presente absorción alguna. La proteína se eluye de la resina con tampón fosfato potásico 0,8 M pH 6,7. Las fracciones que eluyen inmediatamente después de la banda roja que se aprecia en la columna (correspondiente al citocromo c) se reúnen y dializan durante 2 ó 3 horas, a 4°C, frente a ácido acético 0,02 M, con cambios frecuentes del medio externo. La solución dializada se liofiliza.

El volumen total de eluido que se recoge, y en el que se encuentra la ubiquitina, detectada por movilidad en electroforésis-SDS, suele estar comprendido entre 50 y 80 ml, para el tamaño de lote de huevos de insecto y volumen de resina anteriormente expresados.

Regeneración de la Amberlita CG-50 :

La resina cargada en la columna se lava con 2 volúmenes de NaOH 2N. Se retira la resina de la columna y se lava:

- 2 veces con 8 volúmenes de NaOH 2N caliente.
- Con agua desionizada hasta neutralidad.
- Una vez con 8 volúmenes de HCl 2N.
- Con agua desionizada hasta neutralidad.
- Una vez con 8 volúmenes de NaOH 2N.
- Con agua desionizada hasta un pH 6,7-7,0.

Se equilibra con H_3PO_4 5N cuidadosamente hasta pH 6,7.

El equilibrado se completa con tampón fosfato potásico 0,1 M pH 6,7.

Cromatografía en Sephadex G-25 medium.

Preparación del gel :

El sólido comercial se mantiene durante 3 horas a temperatura ambiente en un exceso de agua o del sistema de eluido que se vaya a utilizar. El proceso puede acelerarse por tratamiento en baño de agua hirviendo durante 1 hora. Con esta operación se consigue una perfecta hidratación del gel, permitiendo su posterior utilización como soporte de cromatografía de penetrabilidad. A continuación, es preciso desgasificar el gel para lo que se somete a vacío con trompa de agua, agitando ocasional y cuidadosamente.

El gel así tratado se dispone en una columna cromatográfica (1,6 x 30 cm) y se lava exhaustivamente con ácido acético 0,1 M, conteniendo azida sódica (NaN_3) al 0,02% (p/v). En estas condiciones se puede mantener indefinidamente antes de usar, aunque preferiblemente bajo refrigeración.

Cromatografía de la ubiquitina:

El material liofilizado procedente de la etapa anterior se disuelve en unos 5 ml de ácido acético 0,1 M; se centrifuga para separar el producto no disuelto y la disolución se aplica a la columna previamente preparada. Se eluye con la misma solución de equilibrado y las fracciones de 3 ml que contienen ubiquitina, detectada por movi

lidad en electroforé-sis-SDS, se mezclan y liofilizan. El perfil de absorción ultravioleta del eluido se registra a 280 nm mediante un fotómetro de flujo continuo Uvi-cord II.

Regeneración de Sephadex G-25 medium :

Una vez realizada la cromatografía se puede lavar la columna con el mismo sistema de equilibrado, quedando así dispuesta para su posterior utilización. Si se prefiere conservar el gel seco, se retira éste de la columna, se pasa abundante agua destilada sobre placa filtrante y se lava sucesivamente con agua destilada conteniendo proporciones crecientes de etanol, y finalmente de etanol puro. El gel así tratado se retira de la placa, se deja secar al aire, y se completa el secado en estufa a 60-70°C.

Cromatografía en Sephadex G-75.

Preparación del gel :

Se realiza en las mismas condiciones descritas para Sephadex G-25 medium, exceptuando el tiempo de hidratación que en este caso es de 24 horas a temperatura ambiente y 3 horas en baño de agua hirviendo.

Cromatografía de la ubiquitina:

El material liofilizado, procedente de la etapa anterior,

se disuelve en 1,5-2,0 ml de ácido acético 0,1 M y se aplica en una columna (1,6 x 80 cm) de Sephadex G-75 previamente equilibrada en ácido acético 0,1 M, conteniendo azida sódica 0,02% (p/v). La columna se eluye en el mismo sistema de equilibrado recogiendo fracciones de 3 ml. Las fracciones que contienen ubiquitina, se reúnen y liofilizan. El perfil de absorción ultravioleta del eluido de la cromatografía se registra a 280 nm en fotómetro de flujo continuo Uvicord II.

Regeneración de Sephadex G-75 :

Para volver a utilizar el gel, se aplican los mismos procedimientos descritos para el Sephadex G-25 medium.

Cromatografía en Sephadex G-50 en urea 6 M.

Preparación del gel:

Se realiza en las mismas condiciones descritas para Sephadex G-25 medium y G-75, pero en este caso el tiempo de hidratación es de 3 horas a temperatura ambiente de 1 hora en baño de agua hirviente.

Cromatografía de la proteína:

El material liofilizado que procede de la cromatografía en Sephadex G-75, se disuelve en ácido acético 0,1 M, urea 6 M y se carga en una columna (1,6 x 80 cm) de Sephadex G-50 previamente equilibrada en ácido acético 0,1 M urea 6 M, azida sódica 0,02% (p/v). Por este procedimiento, el

material se fracciona en tres lotes; los dos primeros, se dializan frente a ácido acético 0,1 M durante 48 horas, cambiando el medio de diálisis cada 4 horas. Una vez dializados, se liofilizan, y se les somete a una nueva etapa de desalado en Sephadex G-25 medium para eliminar la urea restante. El tercer lote se liofiliza directamente, ya que el tamaño molecular de sus componentes no permite su diálisis.

Cromatografía en Amberlita CG-50.

El material liofilizado, procedente de la etapa anterior, se disuelve en 1 ml de tampón fosfato potásico 0,01 M pH 6,6 y se aplica en una columna (4,5 x 1 cm) de Amberlita CG-50, previamente equilibrada en este tampón.

Se lava con el tampón de equilibrado, hasta que la absorción, registrada en un espectrofotómetro de flujo continuo Uvicord II, sea nula. Para eluir la proteína que se ha retenido en la columna se lava con tampón fosfato potásico 0,8 M pH 6,7.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LA FRACCIÓN QUE PROCEDE DEL SEPHADEX G-75.

Cromatografía en Sephadex G-25 a distintos pHs.

Cromatografía a pH ácido:

Se disuelven 9 mg de la muestra obtenida después de la cromatografía en Sephadex G-75, en 1 ml de ácido acético 0,1 M, y

se aplican en una columna (1,6 x 30 cm) de Sephadex G-25, previamente equilibrada con la misma disolución. La elución se lleva a cabo en ácido acético 0,1 M, y se recogen fracciones de 1 ml. El perfil de absorción ultravioleta del eluido de la cromatografía se registra a 280 nm en un fotómetro de flujo continuo Uvicord II.

Cromatografía a pH básico:

Se disuelven 9 mg de la muestra anterior en 1 ml de tampón bicarbonato-carbonato sódico 0,05 M, pH 9,0, y se la somete al proceso cromatográfico descrito anteriormente, pero en una columna equilibrada en el tampón de disolución de la muestra.

Cromatografía en Sephadex G-50.

Se disuelven 15 mg de la muestra obtenida de la cromatografía en Sephadex G-75, en 1,5-2 ml de ácido acético 0,1 M, y se aplican en una columna (1,6 x 47 cm) de Sephadex G-50, previamente equilibrada con la misma disolución de aplicación. Durante la elución se recogen fracciones de 3 ml. El perfil de absorción a 280 nm, se registra en un espectrofotómetro de flujo continuo Uvicord II.

CRITERIOS DE PUREZA.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se ha utilizado el método descrito por Panyim y Chalkley en 1.969, trabajando tanto con soporte cilíndrico como con soporte rectangular. A continuación se describe el proceso en el que se utiliza soporte rectangular.

Procedimiento :

- Montaje del soporte: Las dos placas de vidrio que van a servir de soporte para la polimerización se colocan enfrentadas y separadas por dos espaciadores laterales de metacrilato de 0,4 x 10 x 0,2 cm. Se coloca un tubo de goma blanda de 0,15 cm de diámetro que rodeará los bordes laterales e inferior. Al presionar con pinzas metálicas en los laterales y parte inferior el sistema queda sellado imposibilitando pérdidas de la disolución a polimerizar.

- Polimerización del gel: Se lleva a cabo por mezcla, previa degasificación, de las siguientes disoluciones:

Disolución A: 60% de acrilamida (p/v) recristalizada de acetona.

0,4% de N, N'-metilen-bisacrilamida (p/v) recristalizada de acetona.

Se filtra sobre papel Whatman nº 1.

Disolución B: 43,2% de ácido acético glacial (v/v).

4% de N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED) (p/v) en agua destilada.

Disolución C: 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ (p/v) en urea 4 M.

Se mezclan las disoluciones A, B y C en proporción 2:1:5 y se añade la mezcla en el soporte. La concentración final en acrilamida es del 15% (p/v) y en urea 2,5 M. La polimerización se lleva a cabo en posición vertical y ocurre entre los 30 y 60 minutos siguientes a la mezcla. Para dar forma a los pocillos se cierra el sistema por la parte superior con un peine de metacrilato en el que cada diente tiene unas dimensiones de 0,4 x 0,6 x 0,2 cm.

- Preelectroforesis: Se lleva a cabo en ácido acético 0,9 M. La intensidad es de 15 mA aplicada durante 3 horas.
- Aplicación de las muestras: Se disuelven en ácido acético 0,9 M urea 2,5 M (o sacarosa al 15%) en una concentración de 1-2 mg/ml. En cada pocillo se aplican 20 μl .
- Electroforesis: Se lleva a cabo en el mismo medio de preelectroforesis y en las mismas condiciones.

Electroforesis en gradiente en solución de ácido acético.

Procedimiento:

El montaje del soporte, la preelectroforesis, la aplicación de la muestra y la electroforesis se llevan a cabo de la misma forma que para la electroforesis de Panyim y Chalkley.

- Polimerización de la placa: El medio polimerizante se añade al soporte de polimerización por medio de un formador de gradiente. En el recipiente anterior del forma

~~der~~ se añaden 4 ml de disolución al 7,5% en acrilamida y 0,4% en N, N'-metilen-bisacrilamida. En el posterior 4 ml de disolución al 30% de acrilamida, 0,4% de N, N'-metilen-bisacrilamida. Una vez puestos en comunicación ambos recipientes se añaden 20 μ l de TEMED en cada uno de ellos y 50 μ l de una solución de persulfato amónico de 100 mg/ml. Por succión con una bomba peristáltica se extrae la solución del recipiente anterior, en el que un agitador mantiene la homogeneidad del medio, y se introduce con capilares en la parte inferior de la cámara de polimerización.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Procedimiento:

- Montaje del soporte: Se realiza de la misma forma que en los casos antes descritos.
- Polimerización del gel: Se añade al soporte de electroforesis la mezcla de polimerización, que contendrá:

acrilamida	15%
TRIS	0,37 M, pH 8,8
SDS	0,1%

Como catalizador del proceso se añaden 100 μ l de una solución de persulfato amónico 0,1 g/ml y 20 μ l de TEMED. Sobre el primer gel se polimeriza un gel concentrante de menor porcentaje en acrilamida:

acrilamida	5%
------------	----

TRIS	0,13 M, pH 6,8
SDS	0,1%

Sobre este gel y antes de que polimerice se coloca el peine que moldeará los pocillos de aplicación.

Electroforesis en gradiente en presencia de SDS.

Siguiendo el proceso descrito en el apartado de electroforesis en gradiente en disolución de ácido acético, se añaden 4 ml de disolución de acrilamida al 30% en el pocillo posterior y 4 ml de disolución el 7,5% en el anterior, ambas soluciones estarán preparadas en TRIS 0,37 M pH 8,8 con SDS 0,1%. Sobre el gradiente se polimeriza el gel concentrante descrito en el apartado anterior.

Sistemas de detección de bandas.

- Detección con negro amido: Este sistema se utiliza para gel en tubo de poliacrilamida.

Procedimiento:

Se prepara una disolución de negro amido 0,5% (p/v) en ácido acético al 7% (v/v) en agua, en la que se sumergen los geles durante 4-5 horas al cabo de las cuales se lavan con ácido acético 0,1 M. El exceso de colorante se elimina haciendo pasar una corriente eléctrica de 50-100 mA a través de tiras de algodón impregnadas en ácido acético 0,1 M entre las que se han colocado los geles. El colorante migra hacia el ánodo quedando el gel teñido en aquellas zonas donde existe proteína.

- Detección con azul de Coomassie: Este procedimiento se utiliza tanto para geles como para placas de poliacrilamida.

Procedimiento:

Los geles se sumergen en una disolución que tiene 1 g de azul de Coomassie, 180 ml de metanol, 40 ml de ácido acético y 180 ml de agua destilada, durante 2-6 horas. El exceso de colorante se elimina por sucesivos lavados con ácido acético 0,1 M a 50-60°C.

- Detección por reacción con cloruro de dansilo: Antes de aplicar la muestra en electroforesis, se la somete a reacción con ClDNS que se describirá en un epígrafe posterior. Las bandas de proteínas y péptidos se ponen de manifiesto al iluminar con luz ultravioleta de 254 nm.

- Detección de azúcares (Segrest, 1.972): Se utiliza el reactivo de Schiff.

Reactivo:

Se disuelven 2,5 mg de fucsina en 500 ml de agua, se añaden 5 g de metabisulfito sódico, y 50 ml de HCl 1 N. Se agita la disolución durante 1-2 horas.

Procedimiento:

Se sumergen los geles o la placa en TCA al 12,5% durante 30 minutos para precipitar péptidos y proteínas. Se lava exhaustivamente con agua y se sumerge en ácido periódico al 1% en ácido acético al 3% durante 50 minutos.

Para eliminar el ácido perclórico se lava con agua durante toda la noche. Se sumerge de nuevo la placa o los geles en el reactivo de Schiff en oscuridad, durante 50 minutos. Se lava 3 veces con metabisulfito sódico 0,5% recién preparado durante 10 minutos cada vez. El exceso de colorante se elimina con lavados sucesivos del gel o placa con una solución de 100 ml de ácido acético, 800 ml de metanol y 2 l de agua.

COMPOSICION DE AMINOACIDOS.

Análisis de aminoácidos.

Todos los análisis se llevan a cabo en un analizador automático Durrum modelo D500, equipado con un computador PDP-8M que automatiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado.

Hidrólisis total en HCl 6N.

Se hidrolizan de 5 a 10 nmoles de proteína o péptido en 0,2 ml de HCl tridestilado azeótropo 5,7 M, fenol 0,1% (v/v), a 105°C durante 18, 24, 48, 72, 96, y 120 horas en el caso de proteína y 20 horas en caso de péptidos.

Para calcular los valores de valina e isoleucina, que son liberados lentamente, se usan los valores del hidrolizado a 120 horas. Por el contrario treonina, serina, cisteína, y tirosina, son parcialmente destruidos en 20 horas. Una vez hidrolizada la muestra se seca a vacío en desecador de sobre NaOH con buenos resultados.

Análisis automático.

Las muestras secas se disuelven en 0,2 ml del tampón de aplicación siguiente:

Citrato sódico $2H_2O$	19,61 g.
Tiodiglicol	20,00 ml.
HCl concentrado	16,50 ml.
Fenol	1,00 ml.
Volumen final	1,00 litro.
Concentración de Na^+	0,20 N.
pH	$2,20 \pm 0,01$.

La muestra se pasa a un tubo de teflón (4 cm x 0,3 cm) y previa centrifugación se aplican a la columna del analizador 10-30 μ l de la muestra.

Los tampones de elución utilizados son los siguientes:

	Tampón A	Tampón B	Tampón C
Citrato Sódico $2H_2O$	19,61 g.	19,61 g.	39,22 g.
Tiodiglicol	5,00 ml.	5,00 ml.	-----
HCl concentrado	12,31 ml.	8,37 ml.	0,3 ml.
Fenol	1 ml.	1 ml.	1 ml.
Volumen final	1,00 l.	1,00 l.	1,00 l.
Concentración Na^+	0,20 N.	0,20 N.	1,10 N.
pH	$3,23 \pm 0,01$	$4,25 \pm 0,01$	$7,9 \pm 0,03$

Los tampones se esterilizan mediante filtro millipore y se desgasifican antes de usar. El reactivo de ninhidrina que se utiliza es de Pierce Ch.

La duración del análisis es de 97 minutos, finalizado cada

análisis se regenera la resina de la columna mediante lavado con NaOH 0,3N conteniendo 0,25 g/l de EDTA.

A partir de los datos del análisis se determina la composición de aminoácidos en % molar. El cálculo de los porcentajes corresponden a treonina, serina, valina, isoleucina, y cisteína se lleva a cabo como se describe a continuación.

Contenido de treonina.

Se calcula, a cada tiempo de hidrólisis, el % molar de treonina respecto a cada uno de los aminoácidos cuyo rendimiento es independiente del tiempo de hidrólisis. La media de los 12 valores así obtenidos proporciona el % molar del aminoácido. Una vez obtenido el porcentaje de treonina a cada tiempo de hidrólisis, por promedio de 3 hidrolizados, se procede a la representación de dicho porcentaje en función del tiempo. El valor obtenido por extrapolación a tiempo cero representa el contenido de treonina.

Contenido en serina.

Se calcula de la misma forma que en el caso de treonina.

Contenido en valina.

Se calcula, en el hidrolizado de 120 horas, el % molar de valina respecto a cada uno de los aminoácidos cuyo rendimiento es independiente del tiempo de hidrólisis. La media de los 12 valores así obtenidos proporciona el porcentaje molar del aminoácido. El contenido en valina viene dado por la media de los valores calculados en 3 hidrolizados a 120 horas.

Contenido en isoleucina.

Se calcula de igual forma que la descrita para valina.

Contenido en cisteína.

La cisteína se determina por hidrólisis a 24 horas de la proteína carboximetilada, como carboximetilcisteína. El procedimiento de hidrólisis y análisis de las muestras es idéntico al descrito, excepto que la hidrólisis se lleva a cabo durante 24 horas en HCl tridestilado azeótropo (5,7 M) conteniendo 0,1% (v/v) fenol y 1% (v/v) ácido mercaptoacético, a fin de evitar la destrucción de la carboximetilcisteína. A partir de 3 hidrolizados, en estas condiciones, se calcula el porcentaje molar en que se halla la carboximetilcisteína en relación con los aminoácidos cuyo rendimiento es independiente del tiempo de hidrólisis. El valor medio así obtenido es el porcentaje de cisteína.

Contenido en triptófano.

Se determina espectrofotométricamente siguiendo cualquiera de los procedimientos descritos por Beaven y Holiday (1.952), Edelhoch (1.967) y Bencze y Schmid (1.957). Puede determinarse en analizador automático utilizando la hidrólisis por ácido metanosulfónico (Moore, 1.972).

Procedimiento:

Se disuelven 30 nmoles de proteína o péptido en 80 μ l de ácido metanosulfónico 4N al 0,2% de triptamina (3- β -aminoetil-indol). Se congela el tubo y se cierra a

vacío. La hidrólisis se lleva a cabo a 110°C durante 20 horas. El hidrolizado se diluye 4-8 vol. con tampón citrato pH2,2 y se aplica una alícuota en el analizador.

Evaluación final de la composición de aminoácidos.

Para evaluar la composición final de aminoácidos hay que tener en cuenta los porcentajes molares de los aminoácidos en los que no varía dicho porcentaje con el tiempo de hidrólisis, y los calculados para los aminoácidos que se hidrolizan con dificultad o que se destruyen fácilmente. No se incluye el valor del triptófano que se calculará por alguno de los métodos antes citados.

DETERMINACION AUTOMATICA DE LA SECUENCIA N-TERMINAL.

La determinación de secuencia N-terminal se ha realizado por método automático empleando para ello un Sequencer Beckman 890 B. El programa empleado para la determinación es de 060275 de Beckman Instruments (Palo Alto, California USA) modificado según las características del aparato empleado. Fundamentalmente se ha incrementado la duración de las etapas en las que se produce vacío en la copa de reacción, con objeto de conseguir una máxima eliminación de disolventes y reactivos.

Reactivos:

Reactivo I: Isotiocianato de fenilo en heptano al 5% (v/v).

Reactivo II: Tampón Quadrol (N, N, N', N'-tetra-2-hidroxipropil-etilendiamina-ácido trifluoroacético 1 M en n-propanol/agua (3:4 v/v) pH 9,0).

Reactivo III: Ácido n-heptafluorbutírico anhidro.

Disolventes:

Disolvente I: Benceno.

Disolvente II: Acetato de etilo.

Disolvente III: Cloruro de n-butilo.

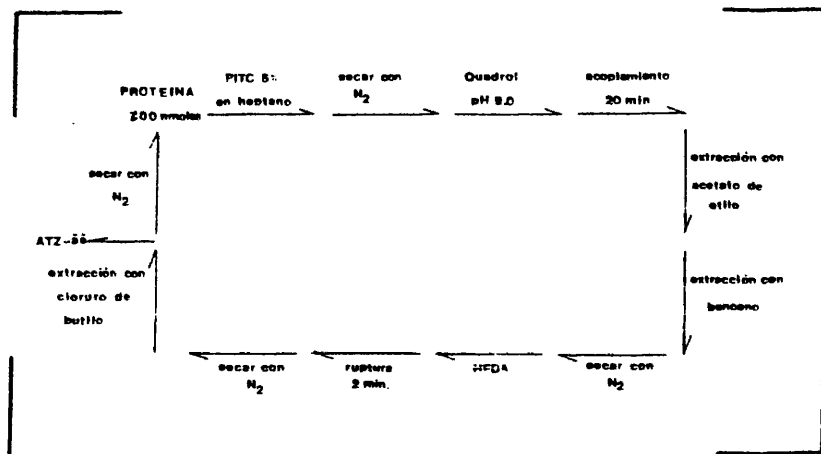


FIGURA 6: Esquema del procedimiento de degradación automática.

El programa empleado consta de 56 etapas y su duración aproximada es de 2 horas. La proteína (3,1 mg-300 nmoles) en estado nativo y disuelta en agua, se introduce en la copa de reacción sometiénola 2 veces al programa de aplicación. Asimismo se realiza un ciclo en blanco (omituyendo las etapas en que intervie

ne el reactivo I) con objeto de eliminar impurezas solubles en los disolventes empleados en el proceso. Tras la realización del ciclo en blanco antes citado, se somete la proteína a sucesivos ciclos de secuencia según el programa seleccionado. Las anilino-tiazolinonas obtenidas en los sucesivos ciclos de degradación, extraídas con cloruro de n-butilo y recogidas en corriente de nitrógeno, son convertidas posteriormente en las correspondientes feniltiohidantoinas (PTHs).

Conversión de ATZ-aa en PTH-aa.

Para identificar los residuos que se obtienen de los ciclos de degradación automática, es necesario transformar los derivados de anilintiazolinona (ATZ-aa) en sus correspondientes derivados de feniltiohidantoina (PTH-aa). La reacción de conversión se realiza en medio ácido y supone la apertura del ciclo de la tiazolinona para reorganizarse y formar un ciclo de tiohidantoina.

Procedimiento:

Se añaden al ATZ-aa seco 0,2 ml de HCl 1,5N, se gasea con N_2 y se incuba durante 10 minutos a 80°C. Se extrae 2 veces con 0,7 ml de acetato de etilo y se seca con flujo de N_2 .

En la fase acuosa permanecen las PTHs de histidina, arginina y ácido cistéico, que se extraen por el siguiente procedimiento:

Se liofiliza la fase acuosa, y se le añade 0,2 ml de Na_2HPO_4 1 M. Se agita y se extrae 2 veces con 0,7 ml de acetato de etilo. Por último se lleva a sequedad con

flujo de N_2 .

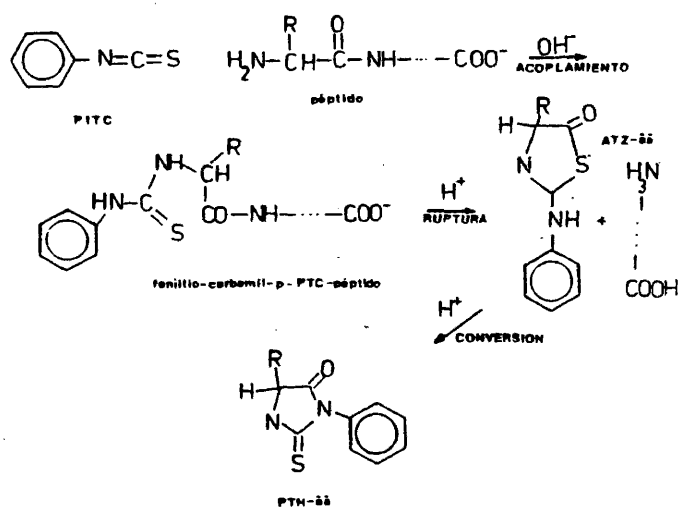


FIGURA 7: Reacciones implicadas en el proceso de degradación automática.

Identificación de las PTH-aa.

Se utilizan cuatro métodos distintos:

Cromatografía gas-líquido de las PTH-aa trimetilsililadas y sin trimetilsililar.

Cromatografía en capa fina de silica-gel de las PTH-aa.

Cromatografía bidimensional en placa de poliamida.

Hidrólisis de las PTH-aa y análisis automático de aminoácidos.

Estos cuatro criterios de identificación se utilizan en secuencia automática, pero en secuencia manual es necesario, por res

tricciones de cantidad, utilizar los más sensibles como son la cromatografía bidimensional en poliamida y la hidrólisis de las PTH-aa y su análisis automático.

Cromatografía gas-líquido.

Se ha utilizado un cromatógrafo Hewlett Packard, con doble columna, detector de llama y programa lineal de temperatura. Tanto el soporte como las columnas de vidrio están silanizadas (Horning, 1.963). El relleno de las columnas (2 mm de diámetro interno y 1,3 m de longitud) es DC-560 al 10% sobre Chromosorb N, 100-120 mesh (Pisano *et al.*, 1.972). El empleo de columnas de vidrio en el cromatógrafo se debe a que los metales catalizan la descomposición de las PTH-aa. Para la detección se emplean alícuotas de 1-3 μ l de las muestras, procedentes de la degradación, disueltas en 20 μ l de acetato de etilo. Para el desarrollo de la cromatografía se emplea un programa lineal de temperaturas, desde 180°C a 260°C, con una variación de 2°C por minuto. El orden de elución de las PTH-aa es el siguiente: PTH-Ala, -Gly, -Val, -Pro, -Leu/Ile, -Met, -Phe. La PTH-Ser sufre descomposición por β -eliminación, eluyendo el dehidroderivado de PTH-Ala y PTH-Gly. La PTH-Thr en cromatografía proporciona dos picos, uno que eluye junto a PTH-Gly y otro (dehidrotreonina) que eluye inmediatamente de PTH-Pro.

Para la identificación de los PTH-derivados de aminoácidos poco volátiles se ha procedido a su previa trimetilsililación. El proceso se lleva a cabo directamente en la microjeringa de inyección. Se cargan en ésta, volúmenes iguales de bis-trimetilsilil-acetamida y PTH-aa en acetato de etilo, aspirándose en este orden e inyectándose el conjunto. Tras la sililación los PTH-derivados

de histidina, tirosina, lisina, aspártico, glutámico, asparagina y glutamina pueden ser resueltos por esta técnica. La sililación permite distinguir entre PTH-Leu y PTH-Ile ya que la primera se desdobla en dos picos.

Cromatografia de PTH-aa en placa de silica-gel. (Wittman-Liebold *et al.*, 1.975).

Para identificar las PTH-aa procedentes de la degradación automática, se puede realizar una cromatografía ascendente en tres sistemas.

Sistemas:

Sistema I: Cloroformo, 1-propanol, 2-propanol (98:1:1).

Sistema II: Cloroformo, metanol (90:10).

Sistema III: Heptano, ácido propiónico, dicloroetano (58:17:25).

[illegible]

FIGURA 8: Movilidad cromatográfica de las PTH-aa.

Procedimiento:

Las muestras se disuelven en metanol/dicloroetano (7:3 v/v) y se aplican en placas de silica-gel 20 x 20 cm., Merk, Darmstad, BDR), con dos patrones de PTH-Ser, -Gly, -Ala, -Val, -Ile, -Pro, -Asp, -Asn y de PYH-Thr, -Lys, -Met, -Glu, -Gln, Tyr, -Phe, -Leu (3 nmoles/ml de cada PTH-aa).

La placa de silica-gel está impregnada con un indicador de fluorescencia. Al iluminar la placa con luz ultravioleta de 254 nm, las PTH-aa se detectan como manchas oscuras. En el primer sistema la mayor parte de los aminoácidos hidrófobos son identificables. El segundo sistema permite localizar Asn, Gln, Ser y Thr. El tercer sistema separa las PTH de Asp, Glu, Arg e His.

Cromatografía de PTH-aa en placa de poliamida.

Las placas de poliamida (Cheng-Ching Trading Co., Taipei, Taiwan o F-1.700 de Scheicherschüll, Dassel, RFA) con unas dimensiones originales de 15 x 15 cm, se cortan en placas cuadradas de 5 cm de lado. Esto tiene por objeto una mayor rapidez en el desarrollo sin que se observe una disminución en el poder de resolución de la técnica.

Procedimiento:

Por una de las caras de la placa se aplica la muestra y por la otra, en posición simétrica respecto al plano de la placa, una mezcla de las PTH-aa patrones. El desarrollo cromatográfico es bidimensional empleándose los siguientes sistemas:

Sistema I: Acido acético al 35% (v/v).

Sistema II: Tolueno, n-pentano, ácido acético glacial (60:30:35 v/v/v) conteniendo 2-(4'-t-butilfenil)-1, 3, 3-oxidiazol (butil PBD) 250 mg/l.

La identificación del residuo se lleva a cabo mediante comparación de los resultados cromatográficos de las dos caras de la placa de poliamida bajo luz ultravioleta de 254 nm. El objeto del butil PBD es incrementar la fluorescencia de la placa, aumentando la sensibilidad de la técnica (Summers *et al.*, 1.973).

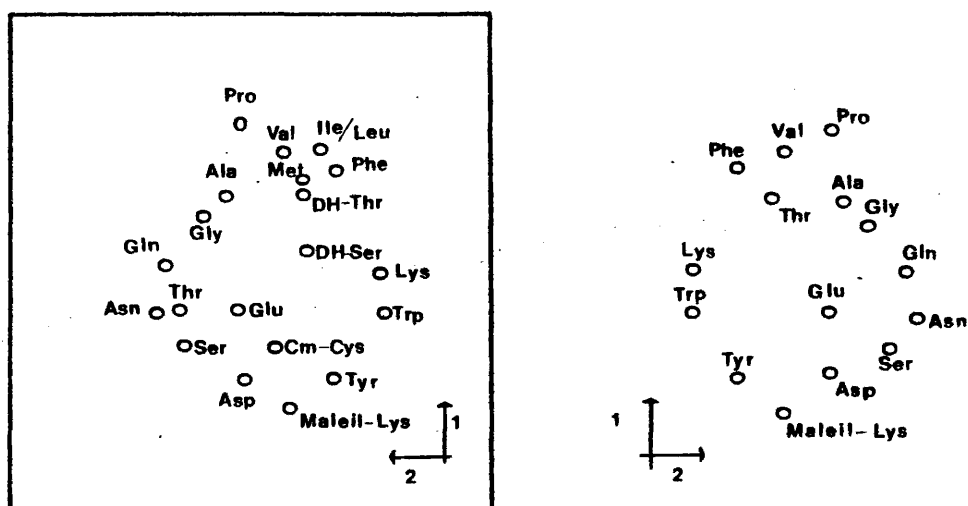


FIGURA 9: Movilidad en cromatografía en placa de poliamida de las PTH-aa.

Hidrólisis de las PTH-aa. (Lai, 1.977).

La hidrólisis de la PTH-aa, libera el aminoácido que se puede identificar por análisis automático. Este método permite de tectar cantidades muy pequeñas.

Procedimiento para proteína:

Se deseca la PTH-aa, y se le añade 0,2 ml de HCl 6N y 5 μ l de SnCl_2/HCl 0,1 g/2 ml HCl 6N. Se incuba a 150°C durante 4 horas. Se deja enfriar, se abre y se seca sobre NaOH. Antes de analizar la muestra, se lava 3 veces con 200 μ l de agua bidestilada.

Procedimiento para péptidos:

En secuencia manual se usó este método, pero se hidrolizó con 0,1 ml de HCl 6N y 10 μ l de SnCl_2/HCl .

HIDROLISIS ENZIMATICA.

Digestión con tripsina.

La tripsina es una enzima que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos en los que interviene el grupo carboxilo de lisina o arginina. Hay algunos enlaces que no se hidrolizan o lo hacen lentamente. Los enlaces Lys-Pro y Arg-Pro, no se hidrolizan debido al N-imido de la prolina. Los enlaces Arg-CySO₃H, Asp-Lys-Leu, Asp-Lys-Ala se hidrolizan parcialmente, así como todos los enlaces de Lys y Arg cercanos a grupos polares o con cargas netas. Los enlaces Lys-Lys y Lys-Arg también son difíciles de hidrolizar. Todos

estos enlaces alteran el número de péptidos que deberían producirse en base a un número de lisinas y argininas conocido (Walsh, 1.970).

Procedimiento:

Se disuelven 40 nmoles de proteína en 50-100 μ l de agua bidestilada. Se añaden 40-60 μ l de N-metil-morfolina 0,2 M para conseguir un pH 7,9. Después se añade tripsina disuelta en agua bidestilada (1 mg/ml) para que la relación enzima/sustrato sea de 1/100 y se incubaba a 37°C durante 4 horas. Después de la hidrólisis se seca a vacío o se liofiliza.

La tripsina debe de estar tratada con TPCK (1-tosilamido-2-feniletíl-clorometil cetona) para evitar la acción de una posible contaminación quimotriptica.

Digestión con quimotripsina.

La quimotripsina hidroliza específicamente los enlaces peptídicos en los que interviene el grupo carboxilo de Tyr, Phe, Trp, Leu y en menor grado Met, Asn, His y Thr. Muy raramente hidroliza por Gly, Ser, Val, Ile, (Wilcox, 1.970).

La hidrólisis se realiza en las mismas condiciones que la hidrólisis con tripsina. La única diferencia estriba en el tiempo de incubación que puede oscilar entre 1 y 4 horas. El tiempo de hidrólisis óptimo es el que proporciona resultados constantes (en nuestro caso 2 horas). La enzima ha de estar tratada con TLCK (N_{α} -tosil-L-lisil-clorometil cetona) con objeto de inhibir la actividad triptica contaminante.

Hidrólisis con clostripaina..

La clostripaina (clostridiopeptidasa B(EC3.4.22.8)) es una sulfhidril proteasa con especificidad por el grupo carboxilo de aminoácidos con carga positiva. La clostripaina, de todas formas, tiene mayor preferencia por arginina que por lisina, y en condiciones de hidrólisis controladas se puede limitar la hidrólisis a los enlaces peptídicos en los que interviene el grupo carboxilo de este aminoácido. Hidroliza bien los enlaces de arginina resistentes a la tripsina (W.M. Mitchell, 1.971).

Procedimiento para "fingerprint":

Se disuelven 0,4 mg de proteína en 100 μ l de tampón fosfato sódico 0,05 M pH 7,7 y se le añade 4 μ l de una solución acuosa de clostripaina (1 mg/ml), a la mezcla se añade 2-mercaptoetanol hasta 1 mM. Se incuba 5 horas a 33°C. y se liofiliza.

ENZIMA	TIEMPO	TEMPERATURA	pH
Tripsina	4 h	37°C	7,9-8,1
Quimotripsina	2 h	37°C	7,9-8,1
Clostripaina	5 h	33°C	7,7-8,0

TABLA 2: Condiciones de hidrólisis enzimática.

SEPARACION DE LOS PEPTIDOS:

La mezcla de péptidos obtenida en las diferentes rupturas enzimáticas, hay que fraccionarla en sus distintos componentes. Para separar los péptidos se ha empleado la técnica de "fingerprint" que nos permite la separación completa de todo el conjunto de péptidos sin recurrir a otras técnicas y realizar un estudio de la electronegatividad e hidrofobicidad de los péptidos.

Una vez separados los péptidos, se pueden extraer y analizar su composición de aminoácidos y detectar el residuo N-terminal.

Separación en "fingerprint" en capa fina de celulosa.

Es una técnica combinada de dos métodos. Una electroforesis a pH 4,4 que separa los péptidos según la carga global de éstos, y una cromatografía ascendente que los separa en función de su polaridad.

Procedimiento:

Se disuelven 20-40 nmoles de hidrolizado en 20 μ l del tampón de electroforesis pH 4,4:

Piridina, ácido acético, acetona, agua (2:4:15:76).

Se aplica la cuarta parte en una placa de celulosa en capa fina (Polygram CEL 300 ó 400, 20 x 20 cm de 0,1 mm de espesor; Macherey-Nagel & Co., Düren, RFA) en una esquina a 3 cm de cada borde, en el otro extremo se aplica como marcador de referencia una disolución de amidoswartz y DNS-Lys en etanol. Se humedece la placa desde los dos extremos procurando que los dos frentes lleguen al punto de aplicación simultaneamente.

La electroforesis se efectúa en una cubeta (Desaga, Heildelberg RFA), durante 2 horas y a 400 V; la intensidad en estas condiciones es de 16-20 mA.

Después de la electroforesis, se deja secar al aire al menos durante 2 horas, y se realiza la cromatografía ascendente en el siguiente tampón:

Piridina, n-butanol, ácido acético, agua (50:75:15:60).

Hay que procurar que la aplicación quede entre 1,5-2 cm del tampón de cromatografía para evitar turbulencias.

Una vez secada la placa, se procede a la coloración con el reactivo deseado.

Extracción de los péptidos.

Después de reproducir el "fingerprint" (fotografía, calco..) se rascan las manchas con espátula y se transfieren a tubos Eppendorf de 1 ml (Hamburg, RFA). El método de extracción descrito en la bibliografía es el siguiente:

- Para análisis de aminoácidos se extrae en HCl 5,7N 2 veces con 100-200 μ l. Se agitan los tubos 30 minutos y se centrifugan durante 4 minutos en centrífuga de mesa. el sobrenadante se trasvasa a los tubos de hidrólisis.
- Para determinar el aminoácido N-terminal o realizar estudios de secuencia, se extrae con ácido acético del 30-50% 2 veces con 200 μ l.

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto un nuevo método de extracción, en el que se ha aumentado mucho el rendimiento con

respecto al método antes descrito.

Procedimiento:

Utilizando las condiciones antes descritas, pero sustituyendo la agitación de 30 minutos por sonicación en un baño Bronson B-220, se extraen los péptidos de la celulosa. Antes de iniciar la sonicación y después de realizarla se agitan los tubos durante 15 seg. para suspender la celulosa.

Cromatografía y electroforesis en capa fina preparativa.

Es la separación en una dimensión utilizando una de las dos técnicas empleadas para "fingerprint". La muestra hidrolizada (de 30 a 180 nmoles) se aplica en una línea de 3-18 cm (10 nmoles/cm) en el cromatograma seco. La coloración de las bandas se logra rociando con el reactivo concentrado de ninhidrina sobre un mm a cada lado de la banda de aplicación. También se puede revelar con fluorescamina 0,001-0,05%. La extracción se hace en ácido acético del 30-50% como para "fingerprint".

REACTIVOS ESPECIFICOS PARA LA DETECCION DE AMINOACIDOS, PEPTIDOS Y DERIVADOS.

Los aminoácidos producen reacciones coloreadas o fluorescentes con algunos reactivos. Esto permite su detección en cromatografía en silica-gel, celulosa o papel, así como en el análisis automático.

Detección con ninhidrina. (M.J. Dognin, 1.978).

La ninhidrina es un reactivo específico de grupos amino de proteínas, péptidos o aminoácidos libres. Como la ninhidrina destruye el aminoácido N-terminal es necesario acondicionar el reactivo según el propósito del cromatograma.

Reactivo concentrado:

Se utiliza para detectar la posición de los péptidos en un cromatograma sin la idea de utilizarlos posteriormente.

Se disuelven 3 g de ninhidrina en una disolución compuesta por 30 ml de colidina (2, 4, 6-trimetilpiridina), 100 ml de ácido acético y 870 ml de etanol.

Las manchas tienen generalmente color azul-violeta aunque si el aminoácido N-terminal es glicocola, treonina, serina, tirosina o histidina la coloración es distinta.

Gly : amarillo.

Thr, Ser : gris-verdoso.

Tyr, His : gris-marrón.

Reactivo diluido:

Para extraer los péptidos del cromatograma se debe usar el reactivo anterior diluido 3 veces en etanol. Se pulveriza ligeramente el cromatograma, aunque sea necesario dejarlo toda la noche a temperatura ambiente para que aparezcan las manchas.

Reactivo para las PTH-aa:

Se disuelve 0,1 g de ninhidrina en 5 ml de colidina y 95 ml de etanol. Los feniltiohidantoin-aminoácidos coloreados con ninhidrina tienen la característica de permitir su identificación entre diferentes manchas de PTH-aa en C.C.F. de silica-gel.

PTH-Asp:	marrón-rojizo.
PTH-Asn:	amarillo claro.
PTH-Glu:	gris-verdoso.
PTH-Gln:	verde oscuro.
PTH-Trp:	verde oliva.

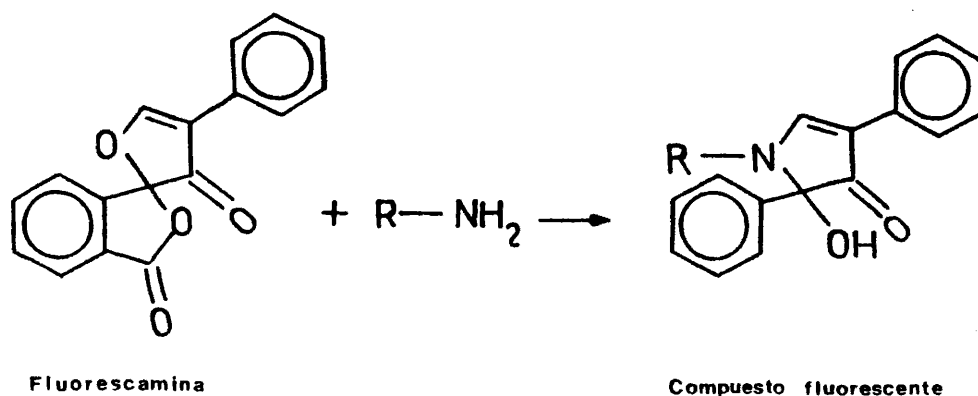
Procedimiento:

Si se usa el reactivo diluido, se pulveriza el cromatograma ligeramente y se seca durante 30 seg. con aire caliente. No conviene calentar mucho tiempo la placa para evitar desamidaciones de los péptidos.

Si se usa el reactivo concentrado, se pulveriza el cromatograma y se puede revelar por calentamiento en estufa a 60°C durante 5 minutos.

Detección con fluorescamina.

La fluorescamina reacciona a pH ligeramente básico (7 a 9) con los grupos amino primarios de aminoácidos y péptidos originando un compuesto fluorescente inestable que desaparece en pocas horas. La reacción es la siguiente:



Reactivos y procedimientos:

El cromatograma se lava con acetona. Después se humedece con una disolución de:

3% de piridina en acetona (Vandekerkhove *et al.*, 1.974) ó

1% (v/v) de trietilamina en acetona (Méndez y Lai, 1.975).

y se deja secar 5 minutos a temperatura ambiente.

Se rocía el cromatograma abundantemente, o se sumerge en una solución de fluorescamina de concentración variable dependiendo de la cantidad de péptido a detectar:

0,001% en acetona para 500 pmoles o más.

0,005% en acetona para 200 pmoles o más.

0,03% en acetona para 30-200 pmoles.

Se deja secar 5 minutos al aire, se lava con acetona y se vuelve a secar 5 minutos. Las manchas son visibles con luz ultravioleta de 336 nm.

La fluorescamina a concentración 0,03% destruye únicamente el 1-5% del aminoácido N-terminal (Méndez, comunicación personal), lo que hace a esta técnica muy útil para extraer los péptidos procedentes de "fingerprint".

Reactivo específico para tirosina. (Acher y Crocker, 1.952).

Reactivo:

0,1% de α -nitroso- β -naftol en etanol al 95% en agua (v/v).

Procedimiento:

Se rocía el cromatograma con el reactivo, se seca con aire caliente y a continuación se rocía con disolución acuosa al 10% en HNO_3 . El cromatograma se seca por calentamiento en estufa a 105°C durante 5 minutos. Se puede seguir este procedimiento aun después de revelar con ninhidrina.

Los péptidos con Tyr se colorean de rosa. La histidina puede interferir pues también se colorea. No hay que confundir estas manchas rosadas con las que aparecen al pulverizar con α -nitroso- β -naftol, ya que se colorean todos los péptidos. El HNO_3 hace de

saparecer esta coloración inicial manteniéndose únicamente la de los péptidos con tirosina.

Reactivo para arginina. (Yamada e Itano, 1.966).

Reactivo:

0,02% de fenantrenoquinona en etanol mezclado 1:1 con una solución del 10% de NaOH en etanol al 60% en agua (v/v).

Procedimiento:

Se rocía el cromatograma con una disolución recién preparada del reactivo y se seca al aire durante 30 minutos.

Los péptidos con arginina presentan fluorescencia bajo luz ultravioleta de 365 nm. Se puede revelar con ninhidrina después.

Reactivo para arginina. (Sakaguchi, 1.925).

Reactivo:

Disolución A: α -naftol 0,01%, urea 5%, y KOH 5% en etanol.

Disolución B: 0,7 ml de bromo en 100 ml de NaOH 0,5N.

Procedimiento:

Se rocía el cromatograma con la disolución A recién preparada y se seca al aire. Después se rocía con la disolución B y se vuelve a secar al aire.

Los guanido-derivados se colorean naranja-rojizo.

Reactivo para triptófano.

Reactivo de Ehrlich:

1 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 10 ml de HCl y
90 ml de acetona.

Procedimiento:

Se rocía el cromatograma con el reactivo y se seca rápidamente a 105°C.

Los péptidos que contienen triptófano se colorean púrpura.
Se puede revelar antes con ninhidrina.

Reactivo para histidina y tirosina.

Reactivo :

Disolución A: Ácido sulfanílico al 1% en HCl 1N.

Disolución B: NaNO_2 al 5%.

Disolución C: Na_2CO_3 al 15%.

Procedimiento:

Se mezclan volúmenes iguales de la disolución A y B y se dejan reposar durante 5 minutos a 4°C. Se añade un volumen igual de C y se rocía el cromatograma.

La histidina aparece como una mancha naranja-rojizo (Mann y Leone, 1.953).

DEGRADACION MANUAL.

Las proteínas y péptidos son degradados secuencialmente a

partir del extremo N-terminal por fenilisotiocianato o PITC (Edman, 1.949), con la condición de que el grupo α -amino esté libre en forma de amina primaria o secundaria. El esquema de la degradación es el mismo que el expuesto en el proceso de degradación automática.

Los derivados anilínotiazolinona-aminoácidos son inestables y se convierten, en presencia de ácido trifluoroacético, en las correspondientes feniltiohidantoinas.

Combinación de la degradación manual de Edman y la reacción con cloruro de dansilo. (Gray y Hartley, 1.963).

El método de degradación manual dansil-Edman consiste en una degradación con PITC y caracterización del aminoácido N-terminal por reacción con cloruro de dansilo.

- Degradación manual de Edman.

Procedimiento:

A 60 nmoles de péptido o proteína se le añaden 50 μ l de agua bidestilada y 50 μ l de PITC al 5% en piridina. El tubo se gasea con nitrógeno y se cierra; se incuba a 45°C durante 1 hora. La muestra se seca frente a NaOH en desecador usado únicamente para PITC. Posteriormente se añade 200 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) y se incuba 30 minutos a 45°C.

Se vuelve a secar en desecador con NaOH, para TFA. La muestra se suspende en 200 μ l de agua y se extrae 2 veces con 2 ml de acetato de n-butilo. Se separan las

fases orgánica y acuosa por centrifugación. La fase orgánica tiene el ATZ-aa, que se hidrolizará para análisis automático de aminoácidos, se cromatografiará en placa de poliamida o en placa de silica-gel. La fase acuosa se seca a vacío y antes de realizar un nuevo ciclo, se toma una alícuota para dansilación.

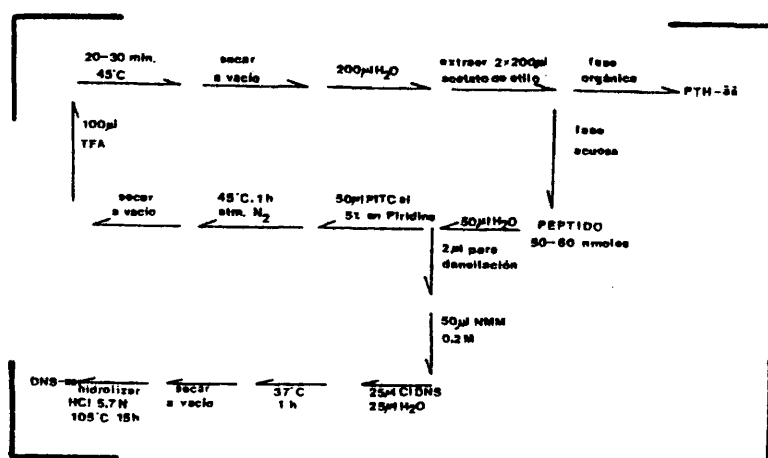


FIGURA 10: Esquema del proceso de degradación manual.

- Dansilación.

Antes de cada degradación manual una alícuota del péptido o proteína se hace reaccionar con cloruro de dansilo para identificar el residuo N-terminal. Los derivados dansil-aminoácido son fluorescentes y se caracterizan por cromatografía.

El procedimiento que se sigue es diferente para péptidos o proteínas.

Péptidos:

El péptido seco se disuelve en 50 μ l de N-metil-morfolina 0,2 M. Se le añade 25 μ l de ClDNS en acetona (2,5 mg/ml) y 25 μ l de agua bidestilada. Se agita y se incuba durante 60 minutos a 37°C. Se seca en desecador y se añade 30 μ l de HCl 5,7N (0,02% β -mercaptoetanol). Se incuba el tubo, una vez cerrado a 105°C durante 15-16 horas. Después de abrir el tubo, se seca en desecador con sosa y se lava con agua bidestilada 3 veces.

Proteínas:

A 1,5 mg de proteína se la añaden sucesivamente 200 μ l de fórmico al 99%, 20 μ l de metanol, 50 μ l de H₂O₂ al 30%. Se mantiene 1 hora a temperatura ambiente y antes de llevar a sequedad en rotavapor se diluye con 2 ml de agua. Se lava un par de veces con agua. Se suspende en acetona y se seca. Se añaden 50 μ l de SDS al 1% y se calienta durante 5 minutos a 100°C. Una vez enfriados se añaden 50 μ l de N-etil-morfolina, se agita vigorosamente, 75 μ l de ClDNS (25 mg/ml en dimetilformamida), se vuelve a agitar y se incuba durante 2 horas a 37°C. Se precipita la muestra con acetona y se centrifuga. El sedimento se lava con acetona al 80% 2 veces y se seca. Se procede a hidrolizar con HCl 5,7N.

Después de la hidrólisis se abre el tubo y se seca en desecador con NaOH. El residuo se disuelve en 5 μ l de etanol al 95% y se aplica en una placa de poliamida de doble cara (5 x 5 cm; DC-

-fertig-folien F1.700 mikro polyamid, Schleicher & Schüll, Dessel, RFA) en forma puntual. En la otra cara se aplica un patrón de DNS-aa con DNS-Pro,-Ile, -Leu, -Tyr, -Thr, -Ser, -Ala, -Glu, disueltos en etanol al 95% en una concentración de 0,1 mg/ml de cada derivado.

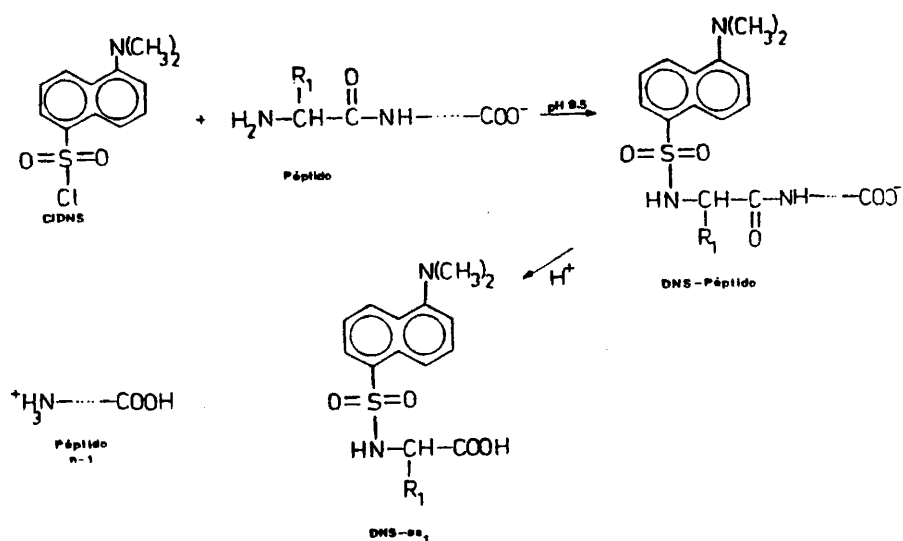


FIGURA 11: Reacciones implicadas en el proceso de dansilación.

Cromatografía de DNS-aa. (Woods y Wang, 1.967; modificada por Hartley, 1.970).

La cromatografía de DNS-aa se hace de forma ascendente con los siguientes sistemas:

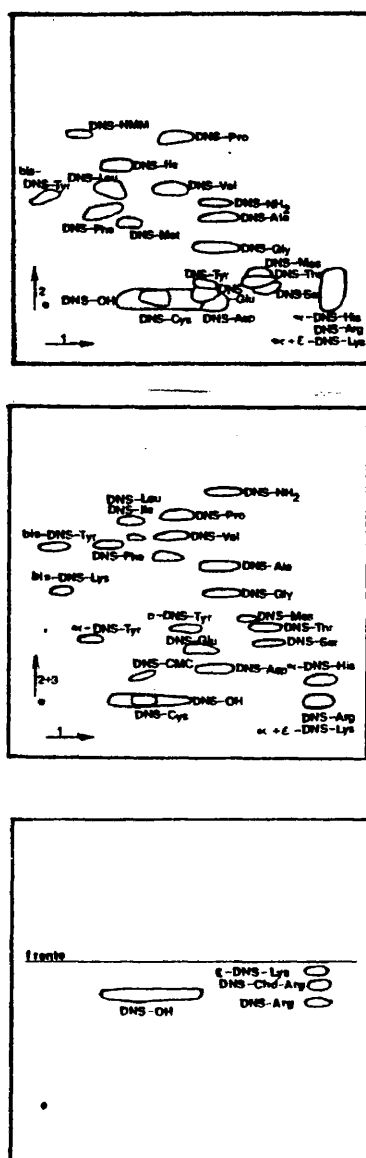


FIGURA 12: Movilidad cromatográfica en placa de poliamida de los DNS-aa.

Sistema I: Disolución acuosa de ácido fórmico 1,5%.

Sistema II: Tolueno, ácido acético (10:1).

Sistema III: Acetato de etilo, ácido acético, metanol (20:1:1).

Sistema IV: Na_3PO_4 0,05% en H_2O , etanol (3:1).

Las cromatografías en los disolventes II, III, y IV se realizan en la misma dirección y en sentido perpendicular a la cromatografía con el sistema I. Se seca con secador entre cada disolvente utilizado. Los DNS-aa aparecen como manchas fluorescentes de color verdoso o amarillento (DNS-Tyr) al iluminar la placa con luz ultravioleta de 254 nm.

Después del 2º sistema es posible identificar por comparación con los patrones todos los DNS-aa excepto DNS-Thr, -Ser, -Glu, -Asp y -Lys. El 4º sistema permite diferenciar DNS-His, -Lys y -Arg.

Las particularidades del método consisten en:

La lisina aparece normalmente como derivado α,ϵ -bidansil-lisina (bis-DNS-Lys) si es N-terminal; si es un residuo interior se presenta en forma de ϵ -DNS-Lys. Conviene pues, correr todos los sistemas. Sin embargo, cada disolvente tiene sus problemas, con el tercero se pierde la resolución entre DNS-Leu y DNS-Ile y entre DNS-Met y DNS-Phe.

En la primera etapa de degradación de los péptidos que contienen tirosina, se observa la o-DNS-Tyr que suele ocupar una posición intermedia entre DNS-Glu y DNS-Asp. Hay enlaces de aminoácidos hidrofóbicos que son mal hidrolizados y se obtienen manchas de DNS-Ile-Val, DNS-Val-Val, DNS-Leu-Ala, etc..

No se puede diferenciar entre Asp y Asn, Glu y Gln, por eso

es necesario utilizar las PTH-aa para completar la información.

Las placas de poliamida deben ser lavadas en NH_4OH /metanol o acetona (1:1, v/v) por inmersión durante la noche y pueden volver a usarse sin problemas. Con esta técnica se pueden detectar cantidades de hasta 0,3 nmoles.

Cromatografía de PTH-aa en placa de silica-gel.

Este sistema se utiliza en secuencia manual para diferenciar entre Asp/Asn y Glu/Glu (Chen, 1.976).

Procedimiento:

Las muestras disueltas en metanol/dicloroetano (7:3 v/v) se aplican en placas de silica-gel (10 x 10 cm, HPTLC silica-gel 60 F₂₅₄₁ Merk, Darmstadt, RFA) a 1 cm de intervalo, y una referencia de PTH-Asp/-Asn y/o PTH-Glu/-Gln. Se realiza una cromatografía ascendente en los sistemas siguientes:

Sistema I: Cloroformo, 1-propanol, 2-propanol (98:1:1).

Sistema II: Dicloroetano, ácido acético (60:10).

Se observa bajo luz ultravioleta de 254 nm, o se colorea con solución de ninhidrina antes indicada.

ESTRUCTURAS DE ORDEN SUPERIOR.

Espectro ultravioleta.

La obtención del espectro ultravioleta de la proteína, se llevan a cabo en cubetas de 1 cm de paso óptico, se ha emplea-

do un espectrofotómetro Cary 118. El espectro se ha obtenido a una velocidad de barrido de 0,2 nm/s. Para la determinación se ha empleado una disolución de enzima en una concentración 0,7 mg/ml en ácido acético 0,1 M pH 4,4.

La obtención de la primera derivada del espectro ultravioleta se hace en las mismas condiciones de barrido y concentración.

Dicroísmo circular.

El espectro de dicroísmo circular se ha obtenido en un dicrógrafo Jobin Yvon, Mark III equipado con un arco de xenon de 250 vatios. La velocidad de registro es de 0,1 nm/seg. Las cubetas empleadas son cilíndricas de cuarzo y con un paso óptico de 0,05 cm para los espectros realizados en el ultravioleta lejano. Todos los datos de elipticidad aparecen expresados como elipticidad media por residuo, considerándose en todos los casos un peso molecular medio de 110 Dalton. Las unidades de este parámetro dicroico son grados $\times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$.

El ajuste de la curva experimental se realizó siguiendo los métodos de Chen *et al.*, 1.972 y Bolotina *et al.*, 1.980.

73

RESULTADOS.

RESULTADOS.

La determinación del residuo N-terminal, por reacción con isotiocianato de fenilo, de la fracción con actividad lítica aislada de huevo de *Ceratitís Capitata* (Fernández-Sousa *et al.*, 1.977), proporcionó resultados que ponían de manifiesto cierta heterogeneidad en dicha fracción.

Entre los contaminantes de la actividad lítica se identificó uno de ellos como ubiquitina. El hecho de que esta proteína no se había aislado en insectos, puso de relieve el interés de la caracterización de la ubiquitina de *Ceratitís capitata*, para el estudio comparativo en distintas especies.

En una primera etapa describiremos el proceso de aislamiento seguido por los autores antes mencionados, para exponer posteriormente los resultados que llevaron a la modificación de este método.

Aislamiento de la fracción con actividad lítica.

Los resultados obtenidos en las etapas cromatográficas: Amberlita CG-50, Sephadex G-25 y Sephadex G-75 son idénticos a los descritos por Fernández-Sousa *et al.*, 1.977. En la figura 13 se recogen los perfiles de estas cromatografías.

La fracción de proteína con actividad lítica obtenida después de la cromatografía en Sephadex G-75, aparece como una única banda en electroforesis en gel de poliacrilamida en medio ácido, y en electroforesis-SDS al 10% de acrilamida. La recromatografía de la muestra en Sephadex G-75 en ácido acético 0,1 M, proporciona un único pico simétrico, de proteína, en el que la distribución de actividad lítica es asimismo simétrica. El análisis de aminoácidos de la

75

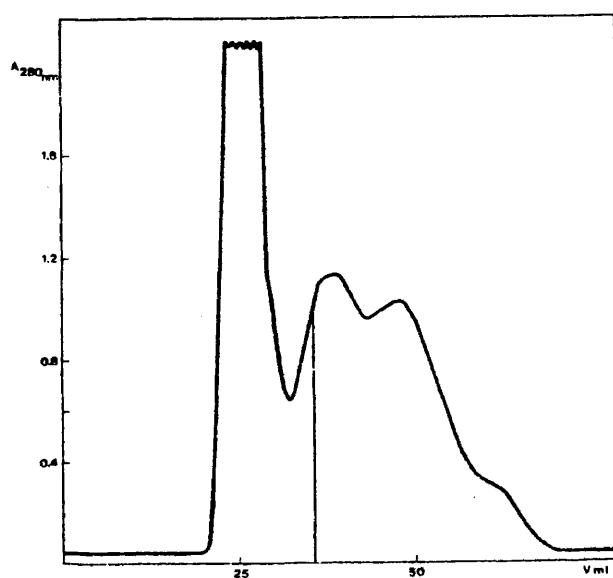
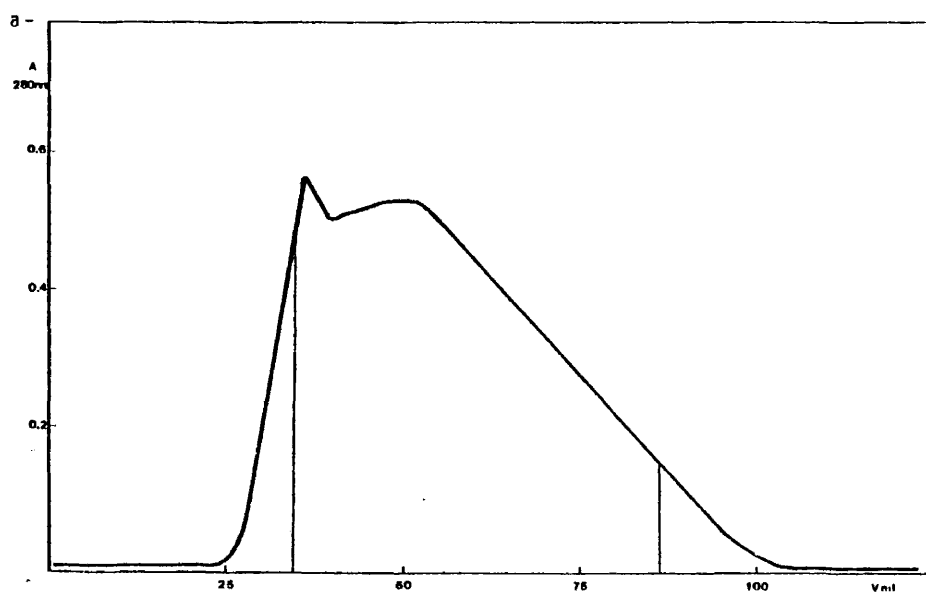


FIGURA 13 a y b: Perfil de absorción a 280 nm de los eluidos de las cromatografías en Amberlita CG-50 (a) y Sephadex G-25 (b) del material obtenido en el proceso de extracción. La fracción en la que se encuentra la ubiquitina se indica con rayas verticales.

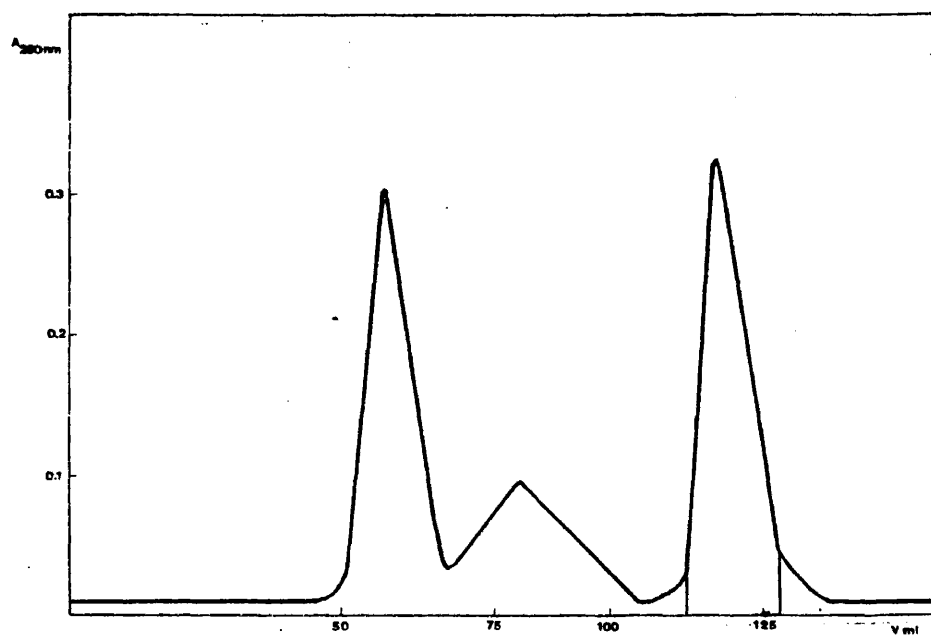


FIGURA 13 c: Perfil de absorción 280 nm del eluido de la cromatografía en Sephadex G-75 de la muestra que procede de la separación cromatográfica en Sephadex G-25. La fracción que contiene ubiquitina se indica en la figura con rayas verticales.

muestra es constante en diferentes extracciones.

Los autores describen como residuo N-terminal GLICOCOLA. El criterio utilizado para dar este resultado fue la dansilación de la muestra, y aplicación del DNS-aa₁ en placa de poliamida. En nuestro caso los criterios utilizados fueron dos, dansilación y análisis del derivado PTH-aa₁ hidrolizado (Méndez y Lai, 1.975). El segundo criterio permite cuantificar los resultados. Estos fueron:

Met	50%	Lys	5,0%
Gly	30%	Ala	5,0%
Asx	5,4%	Glx	4,6%

En placa de poliamida se detecta el derivado dansilado de la glicocola, ya que la metionina aparece como DNS-Met y DNS-Mes y los rendimientos de los últimos son bajos.

Comportamiento cromatográfico de la muestra obtenida en la separación cromatográfica en Sephadex G-75.

Una vez puesta de manifiesto la heterogeneidad de la muestra, se procedió a la separación de sus componentes. Para ello se realizaron cromatografías en Sephadex G-25 en medio ácido y básico, y en Sephadex G-50 en ácido acético 0,1 M.

Cromatografía en Sephadex G-25 a distintos pH.

Se realizaron dos cromatografías en Sephadex G-25, a pH 4,5 y 9,0. Los perfiles de absorción a 280 nm de los eluidos se recogen

en la figura 14.

En la cromatografía en ácido acético 0,1 M pH 4,0 se obtienen dos picos solapados con volúmenes de elución de 22 y 27 ml respectivamente. En la cromatografía en tampón bicarbonato-carbonato sódico 0,05 M pH 9,0, se obtiene un solo pico con un volumen de elución de 19 ml, que coincide con el volumen de exclusión de la columna, medido con azul de dextrano.

El diferente comportamiento cromatográfico en función del pH, parece indicar la existencia de interacciones entre los distintos componentes de la mezcla que se ven favorecidas en medio básico y disminuyen o desaparecen en medio ácido.

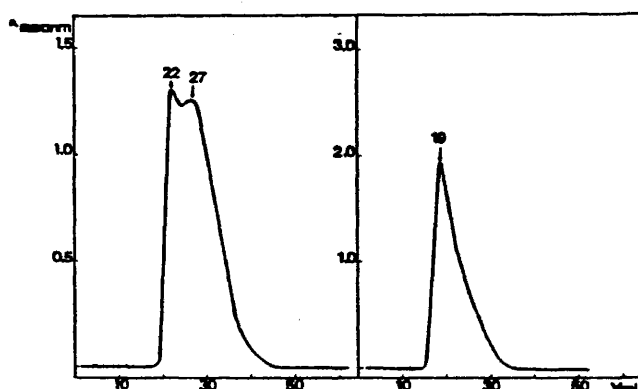


FIGURA 14: Perfil de absorción a 280 nm de las cromatografías en Sephadex G-25 a pH ácido (1) y básico (2).

El hecho de que la ubiquitina, que tiene un pI de 6,7, se retenga en el proceso de aislamiento y extracción en un cambiador catiónico, nos permitió suponer en su momento la existencia de algún tipo de interacción de esta proteína con algún componente básico. Aceptando esta hipótesis, podemos deducir que las interaccio-

nes electrostáticas, contribuyen a este comportamiento, ya que en medio básico la ubiquitina tiene carga negativa y los componentes que produjeron la anormal retención de la proteína en Amberlita CG-50, carga positiva. En medio ácido esta interacción desaparece o disminuiría pues la ubiquitina pasa a tener carga positiva.

Cromatografía en Sephadex G-50 en ácido acético.

En base a los resultados obtenidos en la separación cromatográfica anterior, se intentó separar los componentes en Sephadex G-50. En la figura 15 se recoge el perfil de absorción a 280 nm del eluido de esta cromatografía.

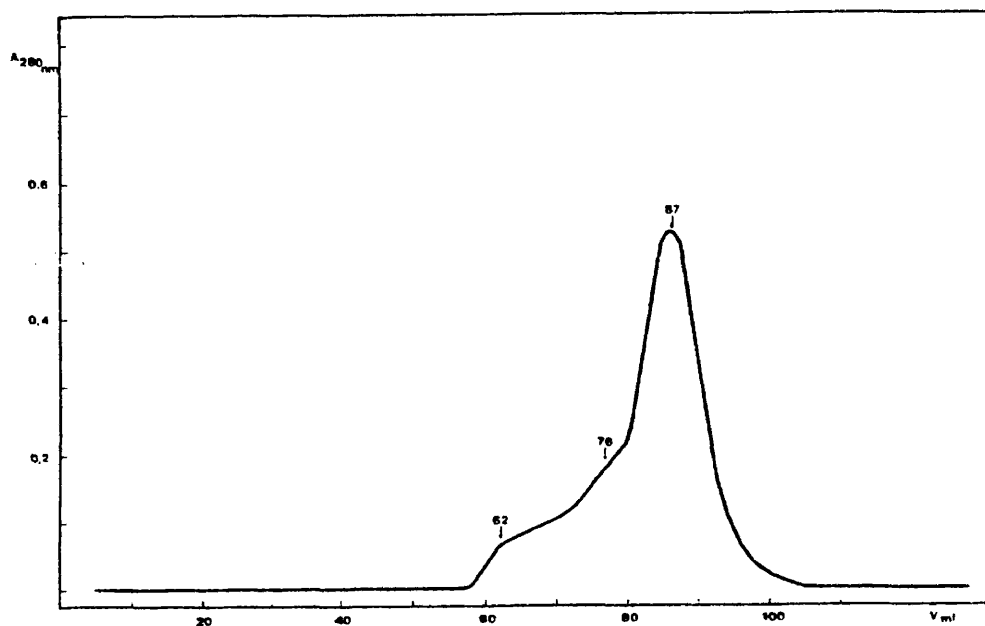


FIGURA 15: Perfil de absorción a 280 nm de la cromatografía en Sephadex G-50.

MATERIAL BIOLÓGICO

HOMOGENEIZACIÓN
AcOH 0,1 M : Cloranfenicol 50mg/l

EXTRACCIÓN
90 min.

CENTRIFUGACIÓN
27000 g 40 min.

PPDO.

SOBRENADANTE

HOMOGENEIZACIÓN

filtración
Whatman nº1

EXTRACCIÓN

CENTRIFUGACIÓN

SOBRENADANTE

PPDO.

TRATAMIENTO TÉRMICO
5°C; 5 min. enfriamiento

CENTRIFUGACIÓN
27000g 15 min.

PPDO.

SOBRENADANTE

CROMATOGRAFÍA EN AMBERLITA CG-50
eluido con NaH_2PO_4 pH 6,6 0,8M

CROMATOGRAFÍA EN SEPHADEX G-25
en AcOH 0,1 M

CROMATOGRAFÍA EN SEPHADEX G-75
en AcOH 0,1 M.

CROMATOGRAFÍA EN SEPHADEX G-50
en AcOH 0,1 M : urea 6 M

CROMATOGRAFÍA EN AMBERLITA CG-50
eluido con NaH_2PO_4 pH 6,6 0,1M

USQUITINA

Eluye un solo pico con un volumen de elución de 87 ml y dos hombros a 76 y 62 ml.

Aislamiento y purificación de ubiquitina de *Ceratitidis capitata*.

El esquema de purificación se ciñe al descrito para la lisozima, hasta la cromatografía en Sephadex G-75. Posteriormente se añaden dos procesos cromatográficos más, cromatografía en Sephadex G-50 en urea 6 M, ácido acético 0,1 M, y cromatografía en Amberlita CG-50.

Cromatografía en Sephadex G-50 urea 6 M.

Para eliminar las interacciones entre los componentes de la muestra, puestas de manifiesto en cromatografías en medios ácido y básico, se realizó una cromatografía en Sephadex G-50 en medio ácido, en presencia de urea 6 M. En la figura 17 se recoge el perfil de absorción a 280 nm del eluido.

La cromatografía de la muestra a través de Sephadex G-50 proporciona tres fracciones con unos volúmenes de elución de 80, 103 y 128 ml respectivamente. Las dos primeras fracciones se dializaron frente a ácido acético durante dos días, y el resto de la urea se eliminó en Sephadex G-25. La primera fracción posee una actividad lítica de 95 u/mg. El barrido espectroscópico de la misma, pone de manifiesto la existencia de ubiquitina en los márgenes señalados en la figura, en alto grado de pureza. Por barrido en electroforésis-SDS de esta fracción se pone de manifiesto la existencia de un componente de Pm alrededor de 15.000 que es la lisozima.

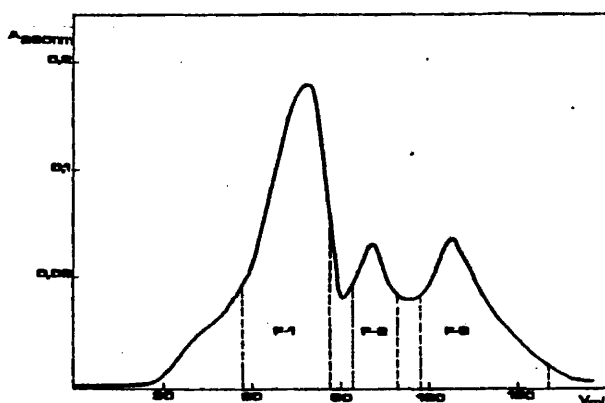


FIGURA 17: Perfil de absorción a 280 nm de la cromatografía en Sephadex G-50 en urea 6 M.

Cromatografía en Amberlita CG-50.

La primera fracción de la cromatografía en Sephadex G-50 en urea 6 M, ácido acético 0,1 M, se aplicó en cromatografía de cambio de ión en Amberlita CG-50. El perfil de absorción a 280 nm del eluido se recoge en la figura 18.

La muestra aplicada se separa en dos componentes. Uno de ellos no se retiene, y en electroforesis-SDS posee una movilidad que corresponde a un peso molecular de 6.500 D. El componente que queda retenido tiene actividad lítica con una $A_e = 2.100$ u/mg.

El componente de bajo peso molecular se degradó secuencialmente en un secuenciador Beckman 890 B. La comparación de la secuencia obtenida (que se expondrá en el apartado correspondiente) con las diferentes secuencias recopiladas por Dayhoff (1.978), per

mitió identificar a este polipéptido como ubiquitina.

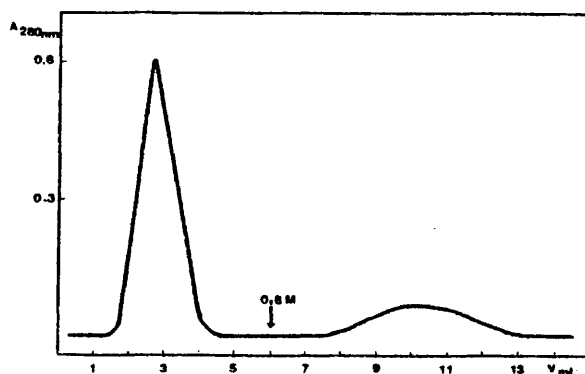


FIGURA 18: Perfil de absorción a 280 nm de la recromatografía en Amberlita CG-50.

El rendimiento de ubiquitina en el proceso de aislamiento y extracción descrito es de 10-15 mg por 200 g . de huevo de *Ceratitidis capitata*.

Criterios de pureza.

La muestra en la última etapa de aislamiento presenta una única banda en electroforesis-SDS en gradiente del 7,5-30% de acrilamida. El análisis del residuo N-terminal, tanto por reacción con cloruro de dansilo, como con isotiocianato de fenilo, da como resultado un único residuo: METIONINA.

Determinación del peso molecular de la ubiquitina.

La determinación del peso molecular de la ubiquitina se realizó en electroforesis en SDS al 0,1% y acrilamida al 19%. Se utilizaron como patrones insulina (5733 D), citocromo c de corazón de caballo (12500 D). En la figura 19 aparece la recta de calibrado de los geles, representando log.peso molecular de las proteínas frente a R_f . La ubiquitina aparece con un peso molecular de 6.500 D. Como se puede comprobar en la secuencia completa de esta proteína su peso molecular es de 8.541 D. La diferencia en el peso molecular encontrada en electroforesis se ha explicado en la introducción, ya que ha sido descrita por otros autores (Seidah *et al.*, 1.978).

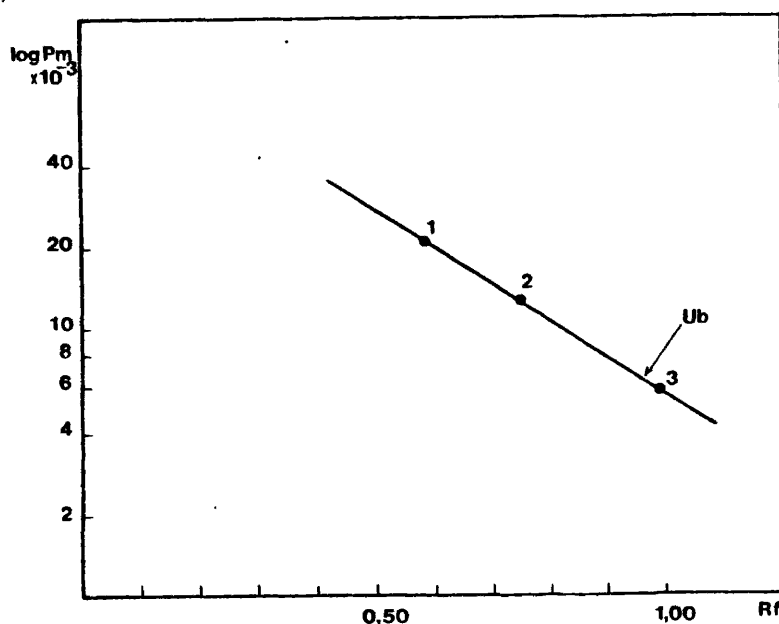


FIGURA 19: Representación de los R_f de las proteínas en electroforesis-SDS al 19% en acrilamida en función del logaritmo de sus pesos moleculares. (1) histona H5, (2) citocromo c, (3) insulina.

Análisis de aminoácidos de la ubiquitina.

El resultado de los análisis de aminoácidos a distintos tiempos de hidrólisis figura en la tabla 3 . Se han calculado los porcentajes de los aminoácidos que no son función del tiempo de hidrólisis (tabla 3a), y los porcentajes de los aminoácidos que son función del tiempo de hidrólisis en la tabla 3 b.

La representación de la variación del porcentaje de treonina y serina en función del tiempo de hidrólisis se recoge en la figura

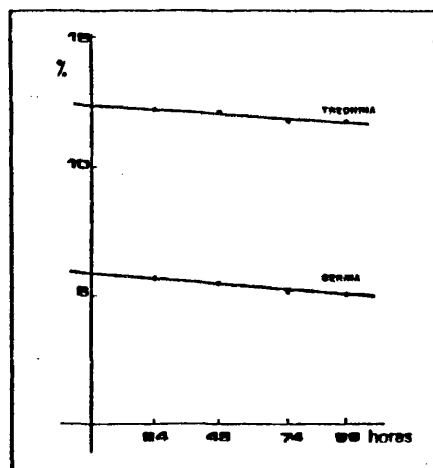


FIGURA 20: Variación de los porcentajes de treonina y serina en función del tiempo de hidrólisis.

En la tabla 4 aparece el análisis completo de la proteína referido a 100 aminoácidos, a 3 fenilalaninas, a 1 metionina, a 4 argininas, a un peso molecular de 8.500 D, y el valor entero de cada aminoácido para una secuencia de 74 residuos.

No se detectaron cisteínas ni como carboximetil-cisteína, en la hidrólisis de la proteína carboximetilada, ni como ácido

a)	24 h.	48 h.	74 h.	96 h.	M
ASX	12,48	12,54	12,37	12,41	12,45
GLX	23,40	23,31	22,93	23,19	23,21
PRO	5,55	5,50	5,54	5,47	5,51
GLY	9,08	9,10	8,98	9,31	9,12
ALA	4,46	4,37	4,57	4,52	4,48
MET	1,32	3,39	2,51	1,74	2,24
LEU	13,40	13,08	13,91	13,72	13,53
TYR	3,06	2,90	2,65	2,74	2,84
PHE	5,26	4,36	4,45	4,73	4,70
HIS	2,16	2,03	2,00	2,01	2,05
LYS	12,80	12,45	12,34	12,57	12,54
ARG	7,03	6,97	7,75	7,59	7,33
b)					t=0
THR	12,15	12,03	11,70	11,64	12,35
SER	5,66	5,42	5,09	4,99	5,80
VAL	---	---	---	7,56	---
ILE	---	---	---	12,09	---

TABLA 3: Análisis de aminoácidos de la Ubiquitina

a) Aminoácidos que permanecen invariables con el tiempo de hidrólisis.

b) Aminoácidos que son función del tiempo de hidrólisis.

%	Residuos/Met	Residuos/3Phe	Residuos/4Arg	Residuos/8.500 D	Valor entero
ASX	9,03	5,4	7,8	6,7	7
THR	8,96	5,3	7,8	6,6	7
SER	4,21	2,5	3,7	3,1	3
GLX	16,84	10,0	14,6	12,5	12-13
PRO	4,00	2,4	3,5	3,0	3
GLY	6,62	3,9	5,7	4,9	5
ALA	3,25	1,9	2,8	2,4	2
VAL	5,49	3,3	4,8	4,1	4
MET	1,63	1,0	1,4	1,2	1
ILE	8,77	5,2	7,6	6,5	6-7
LEU	9,82	5,8	8,5	7,3	7-8
TYR	2,06	1,2	1,8	1,5	1-2
PHE	3,41	2,0	3,0	2,5	2-3
HIS	1,49	0,9	1,3	1,1	1
LYS	9,10	5,4	7,9	6,7	7
ARG	5,32	3,2	4,6	3,9	4
TOTAL				72-77	

TABLA 4: Análisis de aminoácidos de la ubiquitina de *Ceratitis capitata*.

cisteico, en la hidrólisis de la proteína oxidada con ácido performico. Tampoco se detectó triptófano por los métodos descritos en el apartado correspondiente.

Determinación del residuo N-terminal.

Se utilizó el método de reacción con cloruro de dansilo y la degradación manual con PITC y TFA. En ambos casos el reconocimiento del producto originado, dió como resultado el derivado de metionina correspondiente. La metionina aparece parcialmente oxidada en ambos casos.

Espectro ultravioleta de la ubiquitina.

En la figura 21 se recoge el espectro ultravioleta de la proteína.

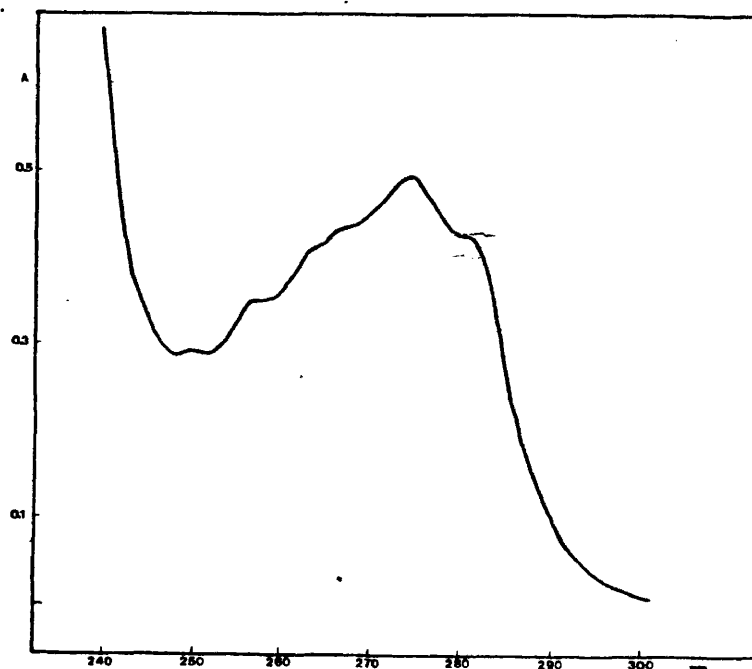


FIGURA 21: Espectro ultravioleta de ubiquitina de *Ceratitidis capitata*.

El espectro obtenido, es el característico de la ubiquitina descrito por Ciechanover en 1.980, con un máximo a 275 nm y cinco hombros a 281, 267, 264, 257,5, y 251,5 nm.

El máximo a 275 nm corresponde a la única tirosina de esta molécula, así como los hombros a 267 y 281 nm, mientras que los hombros a 264, 257,5 y 251,5 nm corresponden a las dos fenilalaninas de la molécula.

En la figura 22 se recoge la primera derivada del espectro.

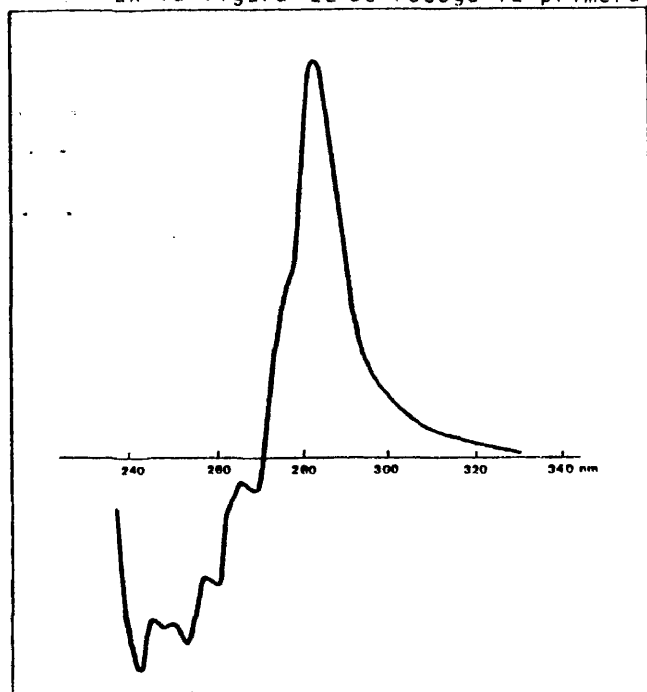


FIGURA 22: Primera derivada del espectro ultravioleta de ubiquitina de *Ceratitidis capitata*.

Espectro de dicroísmo.

El resultado del espectro de dicroísmo a pH neutro de esta proteína se recoge en la figura 23. En esta misma figura se recoge el resultado de la curva calculada por el método de ajuste de Chen, Yang y Martínez (1.972). El error de la curva calculada es

de 614.474, y los porcentajes de las diferentes estructuras son los siguientes:

Hélice α 9,06%

Estructura β 8,99%

Cadena est. 81,95%

Estos resultados son similares a los obtenidos por Jensen *et al.*, en 1.980.

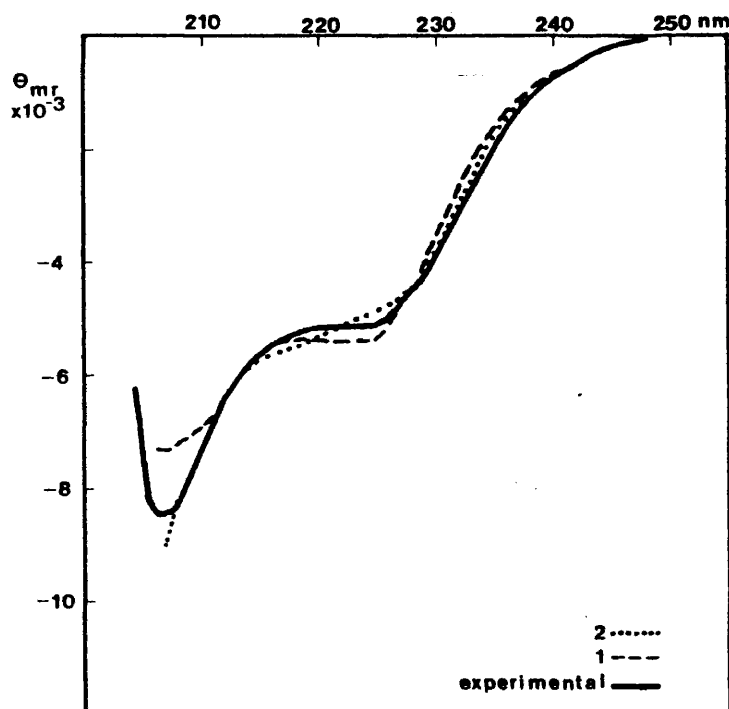


FIGURA 23: Espectro de dicroísmo de ubiquitina de *Ceratitis capitata*. (2) Ajuste de Bolotina *et al.* (1) Ajuste de Chen *et al.*

Si el ajuste se realiza según el método de Bolotina *et al.*, (1.980), los porcentajes difieren obteniéndose:

Hélice α 20,01%
Estructura β 5,25%
Cadena est. 74,74%

El error es de 5.945.506, que indica un buen resultado, ya que este ajuste fue realizado con 10 puntos y el anterior con 9. Estos resultados concuerdan mejor con los obtenidos por Cary *et al.*, (1.980):

Hélice α 28%
Estructura β 12%

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA UBIQUITINA.

Secuencia automática.

Se aplicaron, en la copa del secuenciador automático Beckman 890 B, 300 nmoles de proteína nativa. Después de un primer ciclo de lavado en el que se suprime la etapa de ruptura, se realizaron 30 ciclos de degradación. Las ATZ-aa liberadas fueron convertidas en las PTH-aa correspondientes. En la tabla 5 se reflejan los resultados de los análisis de las PTH-aa liberadas en cada ciclo de secuencia.

Se utilizaron como criterios de identificación:

- Cromatografía gas-líquido del producto sililado y sin sililar.
- Cromatografía bidimensional en placa de poliamida.
- Cromatografía en placa de sílica-gel.
- Reacción con el reactivo de Pauly.
- Reacción con el reactivo de fenantrenoquinona.

Residuo	CGL	CGL Silitado	Poliamida	(1)	(2)	Aminoácido
1	MET	---	---	-	-	MET
2	---	GLN	GLN+GLU	-	-	GLN
3	ILE/LEU	ILE	ILE/LEU	-	-	ILE
4	PHE	---	PHE	-	-	PHE
5	VAL	---	VAL	-	-	VAL
6	---	LYS	LYS	-	-	LYS
7	THR	---	DH-THR+THR	-	-	THR
8	ILE/LEU	LEU	ILE/LEU	-	-	LEU
9	THR	---	DH-THR+THR	-	-	THR
10	GLY	---	GLY	-	-	GLY
11	---	LYS	LYS	-	-	LYS
12	THR	---	DH-THR+THR	-	-	THR
13	ILE/LEU	ILE	ILE/LEU	-	-	ILE
14	THR	---	DH-THR+THR	-	-	THR
15	ILE/LEU	LEU	ILE/LEU	-	-	LEU
16	---	GLU	GLU	-	-	GLU
17	VAL	---	VAL	-	-	VAL
18	---	GLU	GLU	-	-	GLU
19	PRO	---	PRO	-	-	PRO
20	---	---	---	-	-	(x)
21	---	ASP	ASP	-	-	ASP
22	THR	---	DH-THR+THR	-	-	THR
23	ILE/LEU	ILE	ILE/LEU	-	-	ILE
24	---	GLU	GLU	-	-	GLU
25	---	---	ASN+ASP	-	-	ASN
26	---	---	VAL	-	-	VAL
27	---	---	---	-	-	(x)
28	---	---	ALA	-	-	ALA
29	---	---	---	(+)	-	(Arg)
30	ILE/LEU	ILE	ILE/LEU	-	-	ILE

TABLA 5: Análisis de las PTH-aa obtenidas por secuencia automática.

(1) Reactivo de fenantrenoquinona.

(2) Reactivo de Pauly.

En los residuos 3, 8, 13, 23 y 30, aparece PTH-Ile/Leu.

En cromatografía bidimensional en placa de poliamida, no es posible diferenciar entre los derivados de leucina e isoleucina. Para distinguirlos es necesario utilizar la cromatografía en placa de sílica-gel o la cromatografía gas-líquido del derivado sililado. En el último caso la diferencia estriba en que la PTH-Leu se desdobla en dos picos solapados, mientras que no lo hace la PTH-Ile.

Para los casos de derivados poco volátiles, como son los de lisina, ácidos aspártico y glutámico, asparagina y glutamina, el reconocimiento en CGL se realiza previa sililación del producto. Este es el caso de los residuos 2, 6, 11, 16, 18, 21 y 24.

Los residuos 7, 9, 12, 14 y 22, fueron identificados como treonina. La feniltiohidantoin-treonina, en cromatografía gas-líquido, se desdobla en dos picos, uno que eluye junto a PTH-Gly y otro, el derivado de la dehidrotreonina, que eluye después de PTH-Pro. En placa de poliamida aparece también en dos manchas, las correspondientes a la PTH-Thr y a la PTH-dehidro Thr.

1	5	10
MET-GLN-ILE-PHE-VAL-LYS-THR-LEU-THR-GLY-LYS-THR-		
15	20	
ILE-THR-LEU-GLU-VAL-GLU-PRO-(x)-ASP-THR-ILE-		
25	30	
GLU-ASN-VAL-(x)-ALA-(Arg)-ILE-		

FIGURA 24: Resultado de la secuencia automática de la región N-terminal de la ubiquitina de *Ceratitidis capitata*.

La reacción con el reactivo de Pauly y con el reactivo de fenantrenoquinona, fue negativo en todos los casos, excepto en el residuo 29, en el que la reacción con el segundo reactivo dió positiva, pero desarrollándose un color muy débil. Este residuo se identificó inicialmente como arginina, pero posteriormente se pudo comprobar que era lisina.

La aparición de la prolina en la secuencia, produce una caída fuerte en el rendimiento, debido a la dificultad de romper el enlace imido que forma el nitrógeno de la prolina. Se puede solventar esta dificultad, en una nueva degradación automática, realizando etapas dobles de acoplamiento y ruptura allí donde aparece este aminoácido.

En la figura 24 se muestra la secuencia de los 30 primeros residuos de la zona N-terminal con la ausencia de las posiciones 20 y 27. Como se puede observar es muy rica en residuos apolares; aproximadamente el 45% del total de los residuos que componen esta secuencia son residuos de naturaleza hidrofóbica.

Hidrólisis con tripsina.

En la figura 25 aparece el mapa péptidico de la hidrólisis de la proteína con tripsina. El mapa revelado con reactivo diluido de ninhidrina muestra 13 péptidos, enumerados sucesivamente T-1, T-2, y T-12, más un péptido enumerado T-6b. La letra T sirve para distinguirlos de los obtenidos con hidrólisis con quimotripsina y con clostripaina.

Los péptidos T-7 y T-8 presentan color verdoso al revelar la placa con ninhidrina, esto indica la presencia de serina o treonina en su residuo N-terminal. El revelado de la placa con α -nitro

so-8-naftol, reactivo específico para tirosina, da una única mancha rosacea que corresponde al péptido T-8.

El número de péptidos obtenido es congruente con el número de lisinas y argininas obtenidas por el análisis de aminoácidos de la proteína nativa.

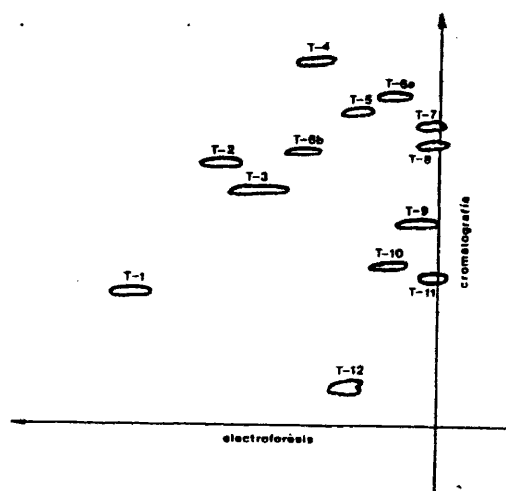


FIGURA 25: Mapa peptídico de la hidrólisis con tripsina de la ubiquitina de *Ceratitis capitata*.

Análisis de aminoácidos de los péptidos tripticos.

En la tabla 6 se recogen los análisis de aminoácidos de los péptidos tripticos extraídos del mapa peptídico obtenido después de la hidrólisis enzimática. Se refieren todas las cantidades a 1,00 lisina o 1,00 arginina, dependiendo de que el péptido posea uno u otro de estos residuos como aminoácido C-terminal.

El análisis de aminoácidos del péptido T-12 coincide, dentro

Péptido aa	1	2	3	4	5	6a	6b	7	8	9	10	11	12 %
ASX								2,38	1,62	1,16	1,04	1,11	9,32
THR			1,93		1,01			2,98	0,96				8,57
SER					1,11			1,33	0,88				4,00
GLX					1,02	1,20	1,14	2,88	1,01	1,82	0,97	2,67	17,36
PRO								1,12				1,77	3,98
GLY			1,09	1,11						1,05		1,35	6,74
ALA	1,05			1,08									3,30
VAL					0,99	1,18	1,27	2,04					4,84
MET						0,56*	0,63*						1,06
ILE				0,93		1,17	1,25	1,98	1,20		1,03	0,90	8,42
LEU		0,97	0,99	0,95	1,68			1,18	1,24	0,98			9,94

TYR									0,95											2,26
PHE								1,15	1,40											3,89
HIS							1,30													1,61
LYS	1,00			1,00	1,00			1,00	1,00	1,00	1,00					1,00				9,50
ARG			1,00				1,00										1,00			5,22
nºResiduos	2	2	5	6	9	6		6	6	16	9	6	4	9						74
N-Terminal	ALA	LEU	THR	LEU	GLX	MET		MET	MET	THR	THR	GLX	ILE	GLX						MET
C-Terminal	LYS	ARG	LYS	LYS	ARG	LYS		LYS	LYS	LYS	LYS	ARG	LYS	ARG						

TABLA 6: Análisis de aminoácidos, N-terminal, C-terminal y número de residuos que componen los péptidos tripticos.

$$* \text{ MET} + \text{MET-SO} + \text{MET-SO}_2.$$

del error experimental, con el de la proteína intacta. Los péptidos T-6a y T-6b son los únicos que presentan metionina en su análisis. Son el mismo péptido en distinto grado de oxidación.

El rendimiento del péptido T-6a es 8 veces superior al del péptido T-6b. Ambos, proceden del que constituye el extremo N-terminal de la ubiquitina determinado por secuencia automática.

La única tirosina se encuentra en el péptido T-8, y la histidina en el T-5. Los otros dos residuos aromáticos se encuentran en los péptidos T-4 y T-6. Coincidiendo con el análisis automático de aminoácidos hay 7 lisinas y 4 argininas. La composición de aminoácidos derivada de la suma de los restos detectados en los péptidos trípticos es la siguiente:

Aminoácido	Pép. trípticos	A. automático	Diferencia
ASX	7	7	-
THR	7	7	-
SER	3	3	-
GLX	12	12-13	-
PRO	3	3	-
GLY	4	5	-1
ALA	2	2-3	-
VAL	4	4	-
MET	1	1	-
ILE	7	6-7	-
LEU	9	7-8	+1
PHE	2	2-3	-
TYR	1	1-2	-
HIS	1	1	-
LYS	7	7	-
ARG	4	4	-
TOTAL	74	74±1	-

La diferencia más notable entre los dos análisis, se presenta en la falta de una glicocola en los péptidos trípticos. Se podría pensar que este residuo se encuentra unido a la arginina C-terminal, como ocurre en ubiquitina de testículo de trucha (Watson *et al.*, 1.978), pero se descarta esta posibilidad, al no haberse detectado el péptido Leu-Arg-Gly, y sí el Leu-Arg.

Rendimiento de la hidrólisis y de la extracción.

En la tabla 7 figuran los rendimientos de hidrólisis, y de extracción del mapa de los péptidos trípticos. Se comparan los resultados del método de extracción por sonicación con los obtenidos por simple agitación.

La hidrólisis de la ubiquitina con tripsina tiene un rendimiento del 74,2%, mientras que la hidrólisis de la muestra de ubiquitina que contiene péptidos de pequeño tamaño molecular tiene un rendimiento del 46%. Los péptidos que interaccionan con la ubiquitina parecen poseer un efecto protector sobre ésta, impidiendo en gran medida el acceso de la tripsina, como ocurre con la ubiquitina aislada de timo de ternera (Low *et al.*, 1.979). La proteína separada de los péptidos que interaccionan con ella, se hidroliza un 161% más que la muestra procedente del Sephadex G-75. Para calcular los porcentajes de hidrólisis se supone un rendimiento de extracción para el péptido T-10 idéntico que para el péptido T-12 (proteína intacta). Esta aproximación es válida, ya que como veremos posteriormente los péptidos que mueven cercanos a la zona de aplicación tienen rendimientos de extracción (D_3) similares. Consideramos el 100% de ubiquitina el número de nmoles de proteína intacta (7,1 nmoles), más el número de nmoles del péptido T-10 (20,4 nmoles), es de

Péptido	(a)			(b)			(c)		
	nmoles	ρ_1	ρ_2	ρ_3	nmoles	ρ_1	ρ_2	ρ_3	$\Delta\rho_1$ ρ_3/ρ_3
1	22,4	74,2	74,7	100,6	6,5	46,0	6,6	14,3	161,3 7,0
2	15,6	74,2	52,0	70,1					
3	14,9	74,2	49,7	66,9	3,8	46,0	3,8	8,3	161,3 8,1
4	15,3	74,2	51,0	68,7					
5	12,0	74,2	40,0	53,9	2,6	46,0	2,6	5,7	161,3 9,5
6a	8,4	74,2	28,0	37,7	2,5	46,0	2,5	5,5	161,3 6,9
6b	1,0	74,2	3,4	4,5					
7	7,6	74,2	25,4	34,1	2,6	46,0	2,6	5,7	161,3 6,0
8	13,8	74,2	46,0	62,0	4,5	46,0	4,5	9,9	161,3 6,3

9	16,4	74,2	54,5	73,7	4,6	46,0	4,6	10,1	161,3	7,3
10	20,4	74,2	68,0	91,6	4,6	46,0	4,6	10,1	161,3	9,1
11	21,5	74,2	71,7	96,6						
12	7,1	25,8	23,7	91,7	5,4	54,0	5,5	10,1	209,3	9,1

TABLA 7: Rendimientos de extracción e hidrólisis de los péptidos tripticos.

(a) Hidrólisis triptica de ubiquitina. Método de extracción: sonicación.

(b) Hidrólisis triptica de ubiquitina con péptidos de la fracción II.

Método de extracción: Agitación.

ρ_1 Rendimiento de la hidrólisis triptica.

ρ_2 Rendimiento de péptido sobre 30 nmoles en (a) y 99 nmoles en (b).

ρ_3 Rendimiento de la extracción de los péptidos tripticos.

cir un total de 27,5 nmoles y no los 30 nmoles aplicados en la placa de celulosa.

El rendimiento de la extracción varía desde un 35% para los péptidos más hidrofóbicos, hasta el 100% para péptidos muy pequeños e hidrofílicos. El tamaño influye en mucha menor proporción que la polaridad del péptido, así el T-11, con 9 residuos se extrae en un 91,6% mientras que T-5, con el mismo número de residuos, pero con un carácter hidrofóbico muy marcado, se obtiene con un 53,9% de rendimiento.

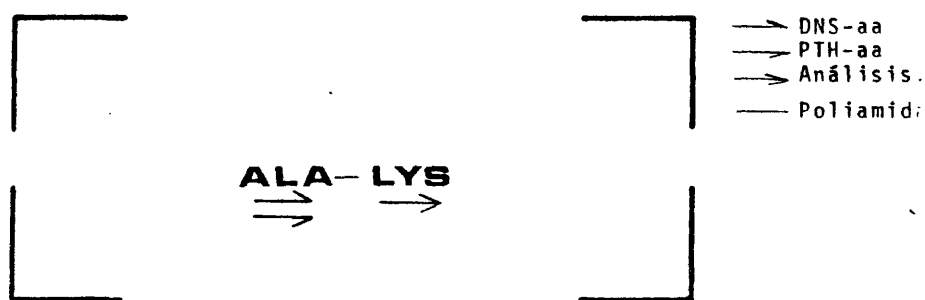
Es de destacar el gran aumento en el rendimiento de extracción por el método de sonicación sobre el de agitación simple. El aumento medio es de 7 a 8 veces, permitiendo la utilización de la técnica de "fingerprint" con fines preparativos. Hasta ahora el empleo de esta técnica se limitaba a la obtención del análisis de aminoácidos, y la determinación del residuo N-terminal. En nuestro caso nos ha permitido la obtención de cantidad suficiente de péptido, para realizar la secuencia manual del mismo por la técnica de Dansil-Edman.

Determinación del N-terminal de los péptidos trípticos.

En la tabla 6 se recogen los residuos N-terminales de los péptidos procedentes de la hidrólisis tríptica. La determinación de los mismos se realizó por reacción con cloruro de dansilo, y cromatografía bidimensional en placa de poliamida, como se describió en materiales y métodos, y por hidrólisis del derivado PTH-aa del primer ciclo de degradación manual y análisis de aminoácidos del producto.

Secuencia manual de los péptidos trípticos.

Péptido T-1.



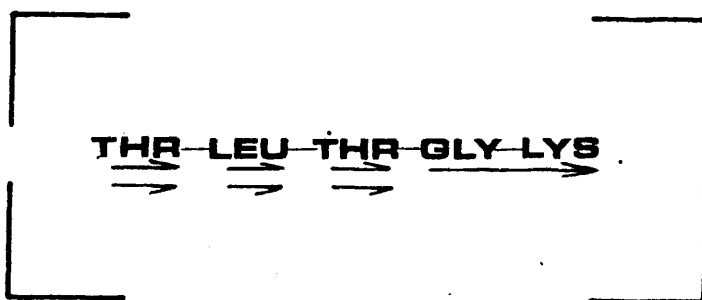
Comprende los residuos 28 y 29. El resultado del análisis de la PTH-Ala hidrolizada, podría atribuirse a la presencia de la serina, pero al resultar un análisis del péptido limpio de serina y detectarse DNS-Ala en cromatografía bidimensional en placa de poliamida, se identificó como alanina.

Péptido T-2.



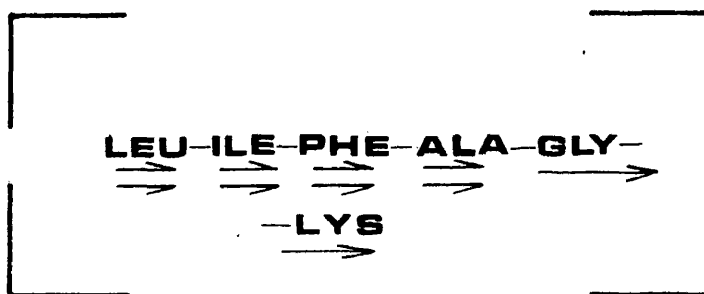
Constituye el péptido C-terminal de la proteína.

Péptido T-3.



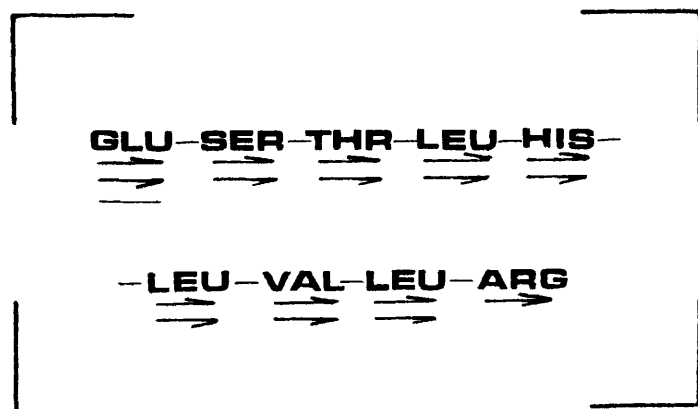
Esta secuencia corresponde al segundo péptido de la región N-terminal, comprendido entre los residuos 7 y 11. Las treoninas fueron identificadas como Thr y ácido α -aminobutírico, en la hidrólisis de la PTH-Thr y análisis automático.

Péptido T-4.



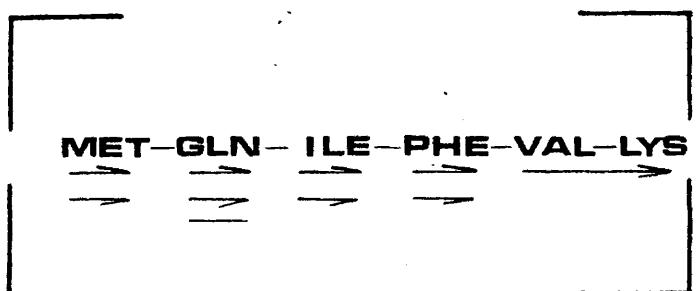
Corresponde a los residuos comprendidos entre las posiciones 43 y 48. Es un péptido relativamente hidrofóbico, de ahí su gran movilidad en cromatografía en BAWP. Se realizó la degradación manual hasta alanina, y el resto se hidrolizó y analizó automáticamente.

Péptido T-5.



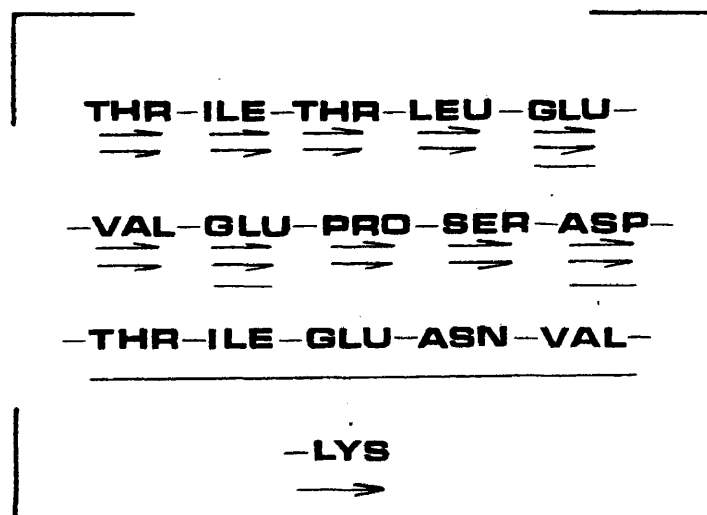
Incluye los residuos comprendidos entre las posiciones 64 y 72. La serina se detecta como tal por reacción con cloruro de dansilo, y como alanina en el análisis de la PTH-aa hidrolizada. La histidina se reconoció por aplicación en papel del residuo y revelado con el reactivo de Pauly, asimismo se realizó la hidrólisis del feniltiohidantoin derivado. Los residuos Glu y Asp fueron analizados también en cromatografía en placa de poliamida. El péptido se degradó hasta la posición 8, hidrolizándose el resto y analizándolo a continuación.

Péptido T-6.



Forman parte de este péptido los residuos 106 de la secuencia. Coinciden con los obtenidos por degradación automática. La metionina, en placa de poliamida, se detectó como DNS-Met y DNS-Mes. La glutamina se diferenci6 del glutámico, por el análisis de la PTH sin hidrolizar, en placa de poliamida, comparándola con patrones de PTH-Glu y PTH-Gln. El péptido T-6b no se secuenció, ya que por análisis de aminoácidos pudo observarse que correspondía a la forma oxidada del T-6a.

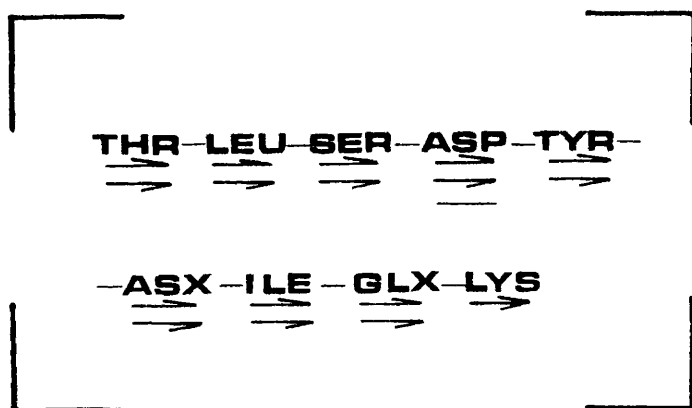
Péptido T-7.



Incluye en su secuencia los residuos 12-27. Es el péptido tríptico de mayor tamaño que posee la ubiquitina. Por degradación manual se llegó hasta la posición 10 del péptido, comprobándose la presencia de serina en la posición 9, este residuo no se había identificado en la secuencia automática de la región N-terminal. El resto del péptido se hidrolizó en medio ácido, comprobándose la

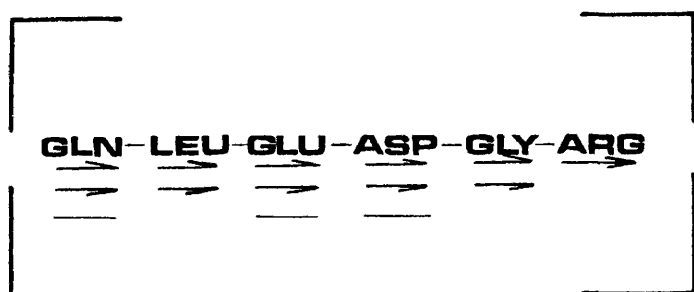
presencia de lisina en el residuo C-terminal. Los residuos 22-27, se ordenaron por solapamiento con la secuencia automática.

Péptido T-8.



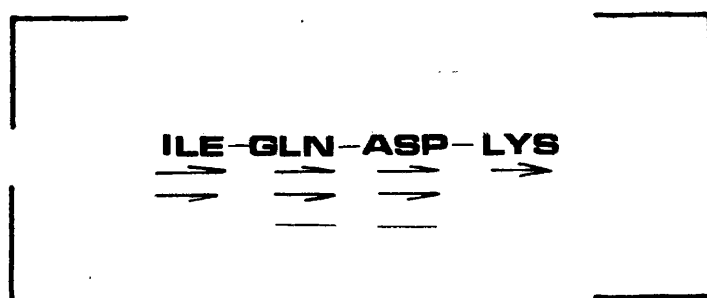
Corresponde a las posiciones 55-63 de la secuencia completa. Se realizaron 8 degradaciones, y el último residuo se identificó por hidrólisis de la fase acuosa de la última degradación. La tirosina se identificó como bis-DNS-Tyr en placa de poliamida.

Péptido T-9.



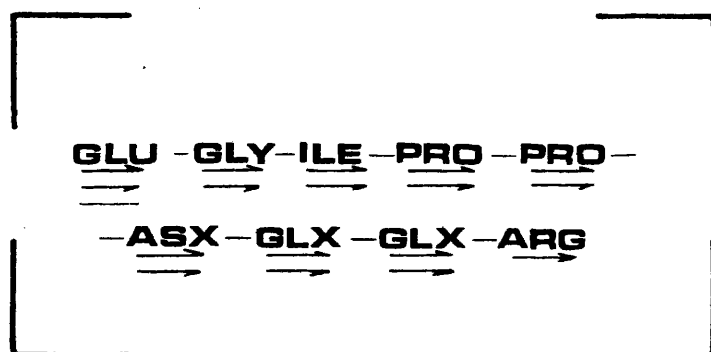
Incluye las posiciones 49-54 de la secuencia completa. Se degradó cuatro ciclos, y se analizó el hidrolizado de la fase acuosa del último.

Péptido T-10.



Corresponde a las posiciones 30-33 de la secuencia completa. Se degradó tres veces el péptido y se analizó la fase acuosa de la última degradación.

Péptido T-11.



Corresponde a las posiciones 34-42 de la secuencia completa. Se degradó el péptido ocho veces, y se procedió al análisis del hidrolizado de la fase acuosa del último ciclo de degradación.

Hidrólisis quimotriptica. Mapa peptídico.

La hidrólisis quimotriptica se realizó durante 2 horas a 37°C y pH 7,9-8,1 ajustado con N-metil-morfolina. La muestra una vez hidrolizada se aplicó en placas de celulosa.

El mapa peptídico obtenido después de la electroforesis y cromatografía descritas en materiales y métodos, se recoge en la figura 26.

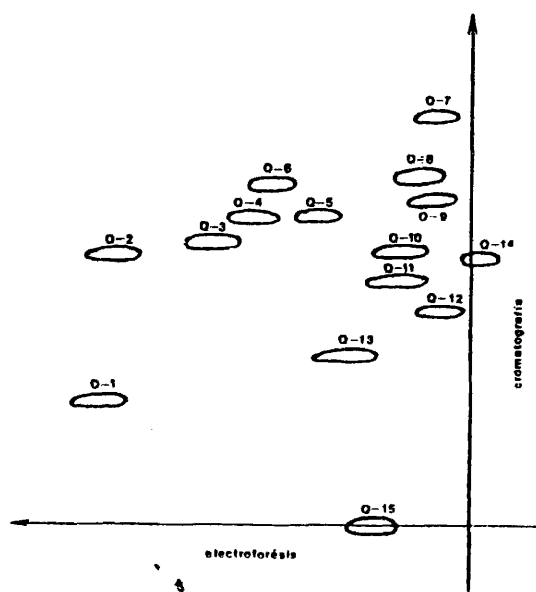


FIGURA 26: Mapa peptídico de la hidrólisis con quimotripina de la ubiquitina de *Ceratitis capitata*.

Péptido aa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ASX										0,85	0,88	3,90	2,10	1,26	7,18
THR				0,87	2,99					0,86	0,83	1,00			6,72
SER										0,54		1,28		1,03	2,94
GLX									1,30	1,78	1,81	7,61	4,20		13,43
PRO												2,90	1,70		3,80
GLY					1,15						1,60	1,31	1,45		3,96
ALA											0,74	0,91	1,25		2,13
VAL				0,81				0,68				1,32			3,21
MET									0,94						1,00
ILE					0,77		1,00		1,28	0,62		2,78	1,65		6,31

LEU		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	8,11		
TYR												1,00	0,97		
PHE						1,00	1,00						1,60		
HIS					0,76								1,13		
LYS				0,56	0,88				0,69	0,69	2,65	2,10	6,07		
ARG	1,00	2,10	1,12						0,66	1,00	0,88		2,89		
N-terminal	ARG	ARG	ARG	VAL	THR	HIS	ILE	LEU	MET	ASX	ALA	GLX	ALA	SER	MET
C-terminal		ARG	LEU	LEU	LEU	LEU	PHE	LEU	PHE	LEU	LEU	LEU	LEU	TYR	
nºresiduos	1	3	2	4	7	2	2	3	4	8	11	28	16	3	71

TABLA 8 : Composición de aminoácidos, N-terminal, C-terminal y número de residuos de los péptidos quimotripticos de la ubiuitina de *Ceratitís capitata*.

El revelado con ninhidrina diluida de las placas pone de manifiesto la existencia de 15 manchas, que se han enumerado consecutivamente del 1 al 15, con el prefijo Q para distinguirlas de las obtenidas en las hidrólisis trípica y con clostripaina.

Los péptidos Q-1 y Q-3 no aparecen en todas las hidrólisis; cuando lo hacen se observa una disminución en el rendimiento del péptido Q-2.

N-terminal de los péptidos quimotrípticos.

Los aminoácidos N-terminales de los péptidos fueron determinados por reacción con cloruro de dansilo, y cromatografía bidimensional en placas de poliamida. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 8.

El péptido Q-5 tiene como residuo N-terminal treonina, aunque no se aprecia color gris-verdoso en el mapa peptídico.

Análisis de aminoácidos de los péptidos quimotrípticos.

El resultado de los análisis de aminoácidos de los péptidos obtenidos por hidrólisis con quimotripsina figuran en la tabla 8. Los cuatro residuos aromáticos de la proteína se encuentran en los péptidos Q-7 y Q-9 (fenilalanina), Q-14 (tirosina) y Q-6 (histidina). La metionina se encuentra en el péptido Q-9, lo que permite localizarle en el extremo N-terminal de la secuencia.

Se ha calculado el número de residuos de cada aminoácido asignando un valor entero a los aminoácidos leucina, fenilalanina y tirosina, y refiriendo las áreas de los demás aminoácidos a la de estos residuos. En el péptido Q-15 se ha calculado el número de

residuos respecto a una metionina. Este péptido tiene un análisis de aminoácidos similar al de la proteína intacta.

El cálculo del número de nmoles del péptido Q-15, por análisis automático de aminoácidos, pone de manifiesto el porcentaje de proteína hidrolizada con quimotripsina, que llega al 41,9%.

Rendimiento de la hidrólisis quimotríptica y de la extracción de los péptidos.

En la tabla 9 se recogen los rendimientos de extracción e hidrólisis de los péptidos quimotrípticos. Para calcularlos se ha supuesto que los rendimientos de extracción de los péptidos T-15 y T-11 son los mismos. De esta forma el total de proteína hidrolizada sería 10,6 nmoles de proteína intacta más 7,66 nmoles de cada péptido, es decir 18,26 nmoles. Sobre esta cantidad se calculan los rendimientos de hidrólisis. Los rendimientos de extracción se han calculado sobre los 24 nmoles \times 0,419 de proteína hidrolizada.

Los péptidos Q-10 y Q-11 presentan los mayores rendimientos de extracción; son péptidos polares. El bajo rendimiento de Q-13 es debido a que está producido por una ruptura secundaria de la quimotripsina, que no tiene el mismo rendimiento de las rupturas primarias. El péptido Q-12 tiene un rendimiento muy por debajo del que le correspondería por su movilidad, ya que parte de este péptido se ve afectado por la hidrólisis secundaria que libera el fragmento Q-13.

Los péptidos más apolares, Q-7, Q-8, Q-4 tienen rendimientos menores. Un caso parecido al ocurrido con Q-12, es el del péptido Q-2, que puede hidrolizarse en menor porcentaje en Q-1 y Q-3.

Péptido	nmoles	$P_{24nmoles}$	$P_{hidrol.}$	$P_{extrac.}$
2	3,99	16,6	41,9	39,7
4	5,00	20,8	41,9	49,7
5	1,56	6,5	41,9	15,5
7	3,75	15,6	41,9	37,3
8	4,79	20,0	41,9	47,6
10	7,50	31,3	41,9	74,6
11	7,66	31,9	41,9	76,2
12	2,13	8,9	41,9	21,2
13	1,79	7,5	41,9	17,8
15	10,60	44,2	58,1	76,2

TABLA 9 : Rendimientos de hidrólisis y extracción de los péptidos quimotripticos deubiquitina de *Ceratitidis capitata*.

Hidrólisis con clostripaína. Mapa peptídico.

La hidrólisis con clostripaína se realizó a 35°C durante 6 horas. El resultado del mapa peptídico obtenido con la muestra hidrolizada se recoge en la figura 27.

El revelado con ninhidrina diluida pone de manifiesto la existencia de cuatro manchas principales, y diez secundarias, que podrían corresponder a rupturas por enlaces peptídicos en los que intervienen lisinas. Los péptidos se han numerado del 1 al 4, con el prefijo C para distinguirlos de los obtenidos en las hidrólisis anteriores.

El único péptido que presenta una coloración diferente es el C-1, que por aparecer gris-verdoso tendría treonina como residuo N-terminal.

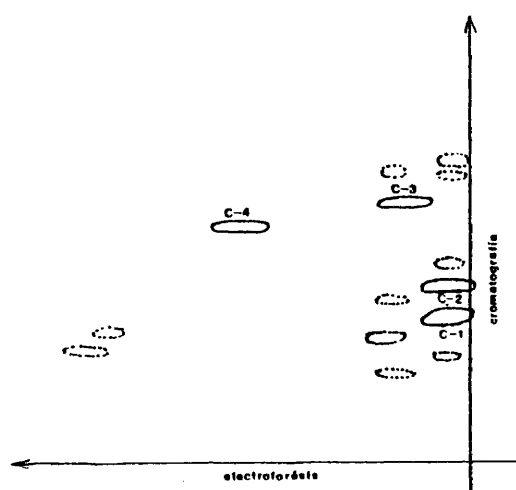


FIGURA 27: Mapa peptídico de la hidrólisis con clostripaina de ubiquitina de *Ceratitis capitata*.

Ordenación de los péptidos tripticos y quimotripticos para la obtención de la secuencia completa de la ubiquitina de *Ceratitis capitata*.

Se han secuenciado automáticamente los primeros treinta residuos de la región N-terminal, y manualmente todos los péptidos

trípticos. También se han obtenido los análisis de aminoácidos de los péptidos quimotrípticos y sus residuos N-terminal. Con estos datos se han podido ordenar los péptidos trípticos, y obtener la secuencia completa de la proteína.

A partir de los treinta primeros residuos, podemos deducir que los péptidos T-6, T-3, T-7 y T-1 se encuentran en la secuencia dispuestos en este orden. El siguiente péptido tiene como residuo N-terminal isoleucina (posición 30 de la secuencia); el único fragmento que cumple esta condición es el correspondiente al péptido T-10.

Los análisis de aminoácidos de los péptidos quimotrípticos nos muestran que el péptido Q-9, con metionina de residuo N-terminal y en cuyo análisis hay fenilalanina, tiene que ser el primer péptido quimotríptico de la ubiquitina. El segundo tiene como residuo diferencial valina (sólo hay cuatro en la molécula), y corresponde al péptido Q-4. El péptido Q-8 no puede colocarse en esta posición, ya que es un dipéptido de valina y leucina. Las otras dos valinas se encuentran en el péptido Q-12, que es de gran tamaño para ocupar esta posición. Si este péptido comprendiese los residuos 5-43 de la secuencia completa, al verse impedida la hidrólisis quimotríptica por las leucinas 8 y 15, tendría que observarse en su análisis de aminoácidos mayor contenido en treonina del que tiene.

El tercer fragmento quimotríptico corresponde a un péptido con tres treoninas, el único que cumple esta condición es el Q-5 que además posee este aminoácido como N-terminal. El péptido Q-12 ocupa la posición contigua. El residuo diferencial es, en este caso, la prolina. El péptido Q-12 posee tres prolinas y su análisis coincide con el del péptido teórico comprendido entre los residuos

16 y 43; únicamente aparece bajo el contenido de valina. Teniendo en cuenta que la hidrólisis ha sido realizada a 18 horas y que este aminoácido se hidroliza mal, no es sorprendente que su contenido relativo respecto a la leucina disminuya. Esto concuerda con el hecho de que la proporción relativa de lisina sea un poco baja, ya que este aminoácido es consecutivo a la valina.

El péptido Q-13 tiene en su análisis dos prolinas; se diferencia de Q-12 en que no posee treonina, serina ni valina, y que el contenido de Asx, Glx e Ile, disminuye notablemente. Este péptido debe corresponder a una hidrólisis secundaria, por contaminación triptica, entre la lisina 27 y la alanina 28. El péptido resultante, comprendido entre estos dos residuos, concuerda con el análisis del péptido Q-13.

La localización de Q-12 como cuarto péptido quimotriptico, implica que T-11 se encuentre a continuación del T-10 en la secuencia. Es la única posibilidad de que las tres prolinas se encuentren juntas en un péptido quimotriptico. El péptido Q-13 confirma la hipótesis, ya que la única posibilidad de un análisis de aminoácidos con dos prolinas y una alanina es la proximidad de T-1 y T-11.

La colocación de Q-12 tras Q-5, presupone que el residuo 43 es una leucina, y por lo tanto el péptido triptico siguiente debe tener este aminoácido en la posición N-terminal. Las dos únicas posibilidades son T-2 y T-4. Para dirimir entre ellas debemos ordenar antes los péptidos T-4, T-5, T-7, T-8 y T-9 entre sí. Los péptidos quimotripticos Q-6, Q-8, Q-7 y Q-14 no determinan ningún orden, ya que son péptidos internos de los tripticos T-5, los dos primeros, y T-4 y T-8 los dos siguientes. Por lo tanto para el solapamiento sólo podemos utilizar Q-1, Q-2, Q-3, Q-10 y Q-11.

En la región 65-72, se detecta la ruptura quimotriptica secundaria del enlace His (68)-Leu(69), y la parcial hidrólisis del enlace Leu(69)-Val(70), lo que provoca la liberación de los péptidos Q-8 (Leu-Val-Leu), y Q-6 (His-Leu). No se han detectado ni histidina libre, ni el péptido Leu-Val; la causa podría ser los bajos rendimientos de estas hidrólisis.

El análisis de aminoácidos del péptido Q-10 pone de manifiesto la presencia de serina en el mismo. Ya hemos localizado la serina 20 en el péptido Q-12, y la serina 57 en el Q-14. La última serina tiene que formar parte del péptido T-5. La hidrólisis quimotriptica se produciría por la leucina 67, y liberaría un fragmento Glu-Ser-Thr-Leu, para completar el análisis del péptido Q-10 hace falta Asx, Glx, Ile y Lys. El único péptido triptico con lisina de residuo C-terminal que puede dar cuenta de estos residuos es el T-8. El T-4 es el otro péptido triptico con lisina en el residuo C-terminal, pero no posee en su análisis Asx ni Glx. Por lo tanto T-5 es el siguiente al T-8 en la secuencia completa de la proteína.

El péptido quimotriptico Q-11 tiene una alanina; la única posibilidad que resta es que proceda del péptido T-4. Este péptido debe unirse a otro, triptico, que posea arginina, para dar cuenta de la que aparece en el análisis de Q-11. No puede ser T-2 ya que faltarían en el análisis Asx, Glx y treonina. La unión deber ser con el péptido T-9. El análisis de aminoácidos del péptido comprendido entre los residuos 46 y 54, es deficiente en treonina y leucina respecto al del péptido Q-11. Por lo tanto, el péptido T-9 se une al T-8 que proporciona los dos residuos que faltan. El enlace entre la leucina 50 y el glutámico 51 permanece intacto en la hidrólisis quimotriptica, probablemente debido a que la carga negativa de la cadena lateral del glutámico impide la catálisis de la

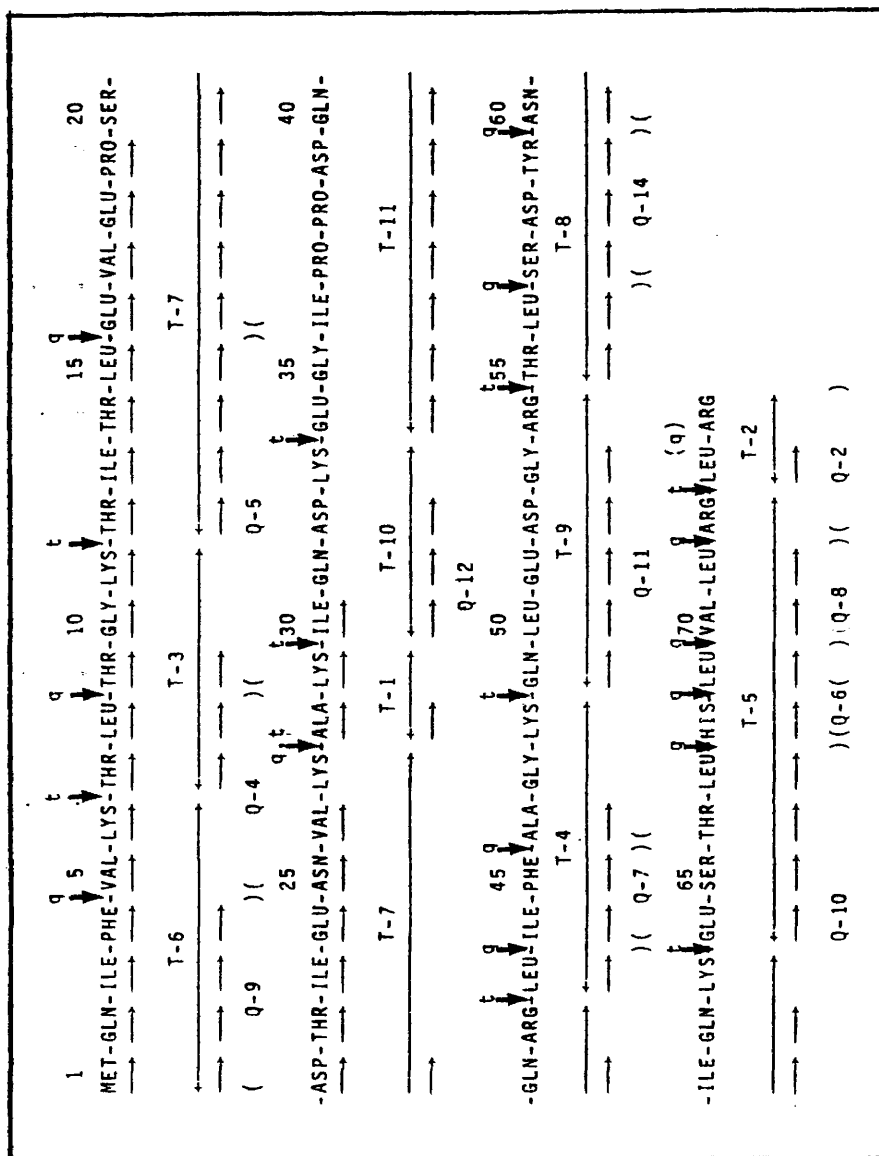


FIGURA 28: Secuencia de aminoácidos completa de la ubiquitina de *Cenatitidis capitata*.

enzima (Wilcox, 1.970).

Tenemos ordenados dos grandes fragmentos de la proteína compuestos por los péptidos trípticos (T-6)-(T-7)-(T-1)-(T-10)-(T-11) y (T-4)-(T-9)-(T-8)-(T-5). Falta por situar el péptido T-2. Tiene dos posiciones alternativas, detrás de T-11 o en el extremo C-terminal de la proteína.

Si el péptido T-2 estuviese detrás de T-11, el comportamiento en la hidrólisis tríptica sería compatible con los resultados obtenidos, pero en la hidrólisis quimotríptica se obtendría un arginina libre, y un dipéptido de Arg-Leu, nunca podría obtenerse tripéptido (Arg₂, Leu). La colocación más probable es en el extremo C-terminal de la proteína, ya que hace posible la existencia de Q-1 y Q-3.

— La aparición de Q-2 está ocasionada por la dificultad, antes mencionada, de la quimotripsina para hidrolizar un enlace con una carga negativa adyacente. Esta carga sería el carboxilo C-terminal de la arginina 74. Este impedimento no se daría con la colocación del péptido T-2 entre T-11 y T-5.

En la figura 28 se recoge la secuencia completa de la ubiquitina de *Ceratitidis capitata* y se indican los solapamientos realizados. En los residuos 39, 40, 41, 60 y 62 no se pudo diferenciar entre los aminoácidos amidados y desamidados. Se han identificado estos residuos por homología con las secuencias de las otras ubiquitinas.

ANALISIS DE LA FRACCION II DE LA CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-50 EN UREA 6 M.

Determinación del N-terminal.

La determinación del residuo N-terminal de la fracción II

que procede del Sephadex G-75 en urea 6 M, proporciona cinco residuos por análisis de aminoácidos de la hidrólisis de la PTH-aa.

La proporción de cada aminoácido en el análisis figura en la tabla 10 . Parecen existir cinco péptidos en relación 4:1:1:1:1 con glicocola, Asx, Glx, Alanina y Lisina como residuo N-terminal.

	%	% aa/% Lys
ASX	9,41	0,92
SER	0,82	0,08
GLX	6,90	0,68
GLY	40,05	3,92
ALA	10,98	1,07
VAL	3,43	0,34
MET	0,15	0,01
ILE	3,50	0,34
LEU	2,86	0,28
TYR	3,55	0,35
PHE	2,68	0,26
HIS	1,63	0,16
LYS	10,22	1,00
ARG	3,82	0,37

TABLA10: N-terminal de la fracción
II de la cromatografía en
Sephadex G-50 en urea 6M.

Separación en cromatografía preparativa en capa fina de los componentes de la fracción II.

Una vez comprobada la heterogeneidad de esta fracción, se separaron sus componentes en CCF en celulosa, en las condiciones descritas en el apartado correspondiente.

El resultado de esta cromatografía se recoge en la figura 29. Se obtienen 5 bandas denominadas A, B, C, D y E. La banda A es la más intensa y al revelar con reactivo diluido de ninhidrina desarrolla un color amarillo-marrón propio de un péptido con glicocola en el residuo N-terminal. La proporción cualitativa en función del color desarrollado en el revelado es la siguiente:

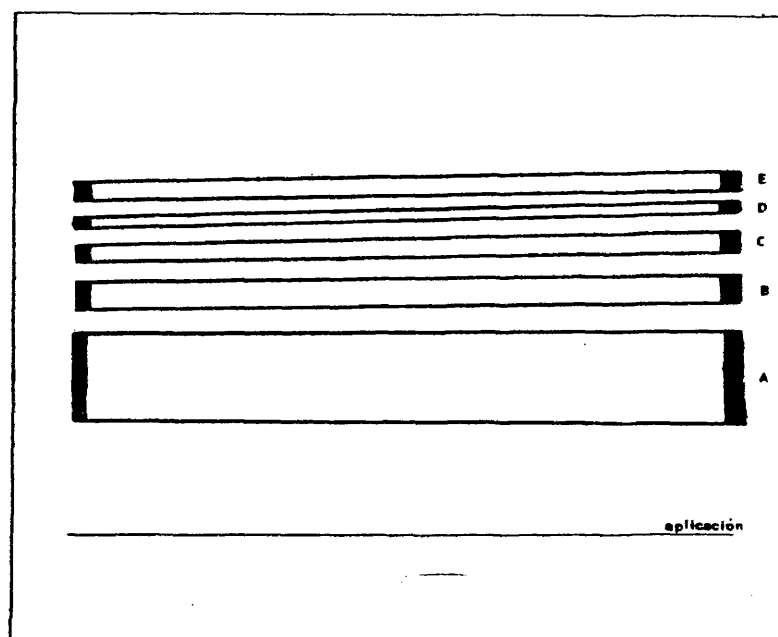


FIGURA 29: Separación en cromatografía en capa fina de los componentes de la fracción II de la separación cromatográfica en Sephadex G-50 en urea 6 M.

Fracción II		A	B	C	D	E
ASX	6,98	---	9,85	9,87	9,78	8,88
THR	3,14	---	4,00	4,47	4,36	4,50
SER	4,66	---	6,02	3,26	6,19	9,61
GLX	7,48	---	13,09	19,90	11,31	14,33
PRO	5,43	---	6,28	3,24	4,10	3,59
GLY	33,94	100,00	19,28	14,03	13,23	17,26
ALA	4,44	---	6,16	8,21	7,20	5,24
VAL	4,35	---	6,75	10,72	13,07	7,90
MET	1,86	---	---	---	2,96	1,49
ILE	2,80	---	4,08	5,25	4,49	2,93
LEU	3,42	---	5,46	5,50	5,80	7,82
TYR	1,40	---	2,07	---	1,19	2,18
PHE	4,43	---	4,21	5,37	3,51	3,03
HIS	2,97	---	1,73	---	1,16	1,27
LYS	7,00	---	6,24	7,83	5,84	4,93
ARG	3,72	---	4,78	8,35	5,81	5,04
CYS	1,98	---	trazas	trazas	---	---

TABLA 1k Análisis de aminoácidos de la fracción II del Sephadex G-50
en urea 6M, y de sus componentes.

Las bandas reveladas, fueron extraídas en ácido acético al 50%, y posteriormente se realizó el análisis de aminoácidos de las mismas.

Determinación del análisis de aminoácidos de los péptidos A, B, C, D y E.

En la tabla 11 se encuentran los resultados de los análisis de aminoácidos de las muestras extraídas de la CCF.

El péptido A tiene un análisis de aminoácidos en el que sólo aparece glicocola, teniendo en cuenta que al revelar con ninhidrina da coloración amarilla, tiene que tratarse de un péptido formado únicamente por este aminoácido, y no glicocola libre. Si se realiza el análisis de aminoácidos de la fracción A, sin hidrolizar la muestra, aparecen los picos correspondientes a Gly y a (Gly)_n, siendo n = 2 ó 3. Se pudo comprobar que el dipéptido o tripéptido se hidroliza en el tampón de aplicación del analizador -citrate sodico pH=2,2- cuando se le mantiene en este medio durante un día. Puede tratarse del dipéptido aislado por Goldknopf *et al.*, 1.977, que forma parte del puente peptídico que une la ubiquitina y la histona H2A en la proteína A24, a través de un enlace isopeptídico.

ANALISIS DE LA FRACCION III DEL SEPHADEX G-50 EN UREA 6 M.

La fracción III del G-50 en urea 6 M, debido a su pequeño tamaño molecular y a la diferencia de concentración con el disolvente, no se pudo separar de la urea, y se realizó su análisis por espectroscopía ultravioleta. El espectro correspondiente al del triptófano, unido por enlace peptídico a una corta cadena de aminoácidos.

Para el cálculo del número de residuos que pueden formar este péptido, suponiendo de que se trate de un solo componente y una sola molécula de triptófano, utilizamos el valor de absorción a 210 nm, restando el componente debido a este aminoácido. El $E^{0,1\%}$ para el enlace peptídico a esta longitud de onda es 20,0. La concentración del péptido la calculamos a partir del valor de absorción a 280 nm y del coeficiente de extinción del triptófano a esta longitud de onda.

$$A_{280} = 0,012$$

$$A_{210} = 0,235$$

$$A_{210} (\text{TRP}) = -,060$$

$$\text{Concentración enlace peptídico} = 8,75 \times 10^{-3} \text{ mg/ml.}$$

$$n = 5,78$$

$$\text{Concentración péptido} = 1,173 \times 10^{-5} \text{ M.}$$

$$A_{210} \text{ concentración péptido} = 0,175.$$

Siendo n el número de residuos y considerando un peso molecular medio por residuo de 110 dalton.

263

DISCUSSION.

DISCUSION.

Proceso de extracción.

En el aislamiento de la lisozima de huevo de *Ceratitis capi tata* se obtuvo una muestra de proteína que se comportaba como especie pura y homogénea. Tanto en electroforesis de Chalkley, como en electroforesis en SDS, al 10% en acrilamida aparece una banda que se tiñe con negro amido o azul de Coomassie. Si se aumenta el porcentaje de acrilamida hasta el 20% o se realiza la electroforesis en gradiente del 7,5-30% en acrilamida, aparece en electroforesis-SDS una banda que corresponde a un peso molecular de 6.500 D. El comportamiento cromatográfico de este polipéptido, que posee un pI de 6,7 y un peso molecular de 8.500 D, es anómalo. Por una parte se retiene en un cambiador catiónico, en condiciones en las que la carga de la ubiquitina es próxima a cero. Por otro lado en cromatografía en Sephadex G-75 eluye en el mismo volumen que la lisozima.

La retención en Amberlita desaparece cuando la ubiquitina se separa en urea 6 M de péptidos con peso molecular de 4.000-5.000 D. La interacción de la ubiquitina con estos péptidos o con proteínas básicas -interacción puesta de manifiesto en el caso de la histona H2A (Hunt *et al.*, 1.977), H2B (West *et al.*, 1.980), péptidos tímicos (Low *et al.*, 1.979), proteínas de reticulocito (Ciechanover *et al.*, 1.980)-, es la causa más plausible de la retención de la proteína en intercambiadores catiónicos.

La interacción es función del pH, como se pone de manifiesto en las cromatografías en medio ácido y básico en Sephadex G-25. En medio ácido éstas tienden a desaparecer, haciéndolo totalmente en

presencia de urea 6 M (Low *et al.*, 1.979).

El peso molecular de la ubiquitina, obtenido en electroforesis-SDS, es sensiblemente menor al obtenido por secuencia de su cadena polipeptídica. Estos resultados han sido descritos por otros autores, no conociéndose aún las causas que lo provocan (Seidah *et al.*, 1.978).

Análisis espectroscópico.

El espectro ultravioleta obtenido para la ubiquitina es idéntico al obtenido por Ciechanover *et al.*, 1.980. Pone de manifiesto la existencia de tirosina en la molécula, y la ausencia de triptófano. En la región 245-260 nm se pueden observar picos correspondientes a las dos fenilalaninas de la proteína.

En el espectro de dicroísmo circular, los resultados obtenidos difieren en dependencia del método de ajuste utilizado, pero en principio, y teniendo en cuenta los estudios de predicción de estructura secundaria (Chou y Fasman, 1.974) existirían entre 4 y 7 residuos de la región N-terminal en estructura β y entre 7 y 15 residuos en la región C-terminal en hélice α . El resto de la proteína adoptaría una estructura estadística aunque muy estable con los cambios de fuerza iónica y pH.

Hidrólisis enzimática.

La determinación de la estructura primaria de ubiquitina de *Ceratititis capitata* se realizó utilizando tres fuentes de información; secuencia automática de los 30 primeros residuos de la región N-terminal, hidrólisis triptica y secuencia manual de los péptidos así obtenidos, y análisis de los péptidos que proceden de la hidrólisis

lisis quimotriptica.

Como ya se indic6 en la introducci6n, existe una controver-sia entre distintos autores sobre el rendimiento de la hidr6lisis de la ubiquitina por enzimas proteol6ticas. Mientras que Schlesinger et al., (1.975) describen que la ubiquitina se hidroliza 6ni-camente en un 25%, Low et al., (1.979) afirman que lo hace en un 75%. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo de investigaci6n, permiten afirmar que la tripsina y quimotripsina acceden con faci-lidad a los enlaces susceptibles de hidr6lisis, obteni6ndose rendi-mientos del 80% en el primer caso y 50% en el segundo. Unica-mente, en el caso de que la prote6na no est6 pura, por permanecer la interacci6n entre la ubiquitina y los p6ptidos que la acompa¹an en el proceso de extracci6n, el rendimiento es del orden del descri-to por Schlesinger.

El papel de estos p6ptidos es desconocido. No podemos afirmar que su interacci6n con la ubiquitina se mantenga *in vivo* o sea un artefacto del proceso de extracci6n, pero es claro su efecto protector sobre la prote6na.

La hidr6lisis con tripsina se realiza de forma completa : todos los enlaces en los que intervienen grupos carboxilos de lisi-na o arginina. No se han detectado rupturas secundarias, ni enla-ces resistentes. Se ha aislado el dip6ptido N-terminal (Leu-Arg), sin detectarse en el mismo residuo alguno de glicocola. Esto supone que la ubiquitina, en el 6ltimo paso de purificaci6n no se encu-entra unida a p6ptido alguno de glicocola, que como se ha menciona-do, formar6a parte del puente de uni6n de esta prote6na con la histona H2A para formar la prote6na A24 (Goldknopf et al., 1.979).

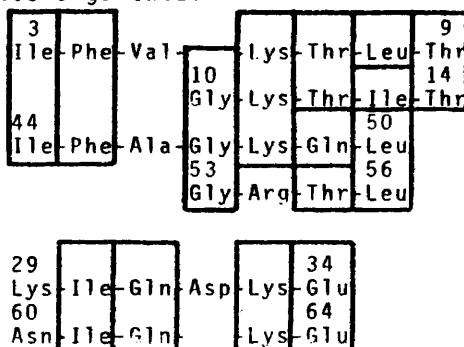
En la tabla 12 se recogen los enlaces que, siendo hidrolizables por la quimotripsina, lo hacen parcialmente o se mantienen

intactos en la ubiquitina; se comparan las diferentes proteínas secuenciadas.

Los enlaces Leu-Thr, Leu-Glu, Leu-Ser, Tyr-Asn, son hidrolizados perfectamente por la quimotripsina en la ubiquitina aislada del huevo de *Ceratitidis capitata*, obteniéndose los péptidos quimotripticos correspondientes. El enlace Leu-Arg se hidroliza parcialmente, y se han detectado los péptidos Arg-Leu-Arg, Arg-Leu y Arg. También sufre hidrólisis parcial el enlace Lys-Ile. En la ubiquitina de *Ceratitidis capitata* se ha detectado una ruptura que no se da en otras UBIP secuenciadas, es la correspondiente al enlace His-Leu, encontrándose el péptido Leu-Val-Leu correspondiente. No se ha detectado histidina libre, pero si se ha podido detectar el péptido His-Leu, lo que pone de manifiesto la hidrólisis parcial del enlace Leu-Val.

Homología interna.

Schlesinger *et al.*, (1.975) sugieren la existencia de un mecanismo de duplicación de un gen ancestral que daría origen al gen de la ubiquitina. Se apoyan en la homología de las secuencias de los fragmentos siguientes:



ENLACE	GRADO DE HIDROLISIS
8 9 LEU-THR	Nula (2), Total (4).
15 16 LEU-GLU	Nula (2), Total (4).
29 30 LYS-ILE	Parcial (3) Total (4).
50 51 LEU-GLU	Nula (1, 2, 3 y 4).
56 57 LEU-SER	Parcial (2), Total (4).
59 60 TYR-ASN	Parcial (2), Total (4).
68 69 HIS-LEU	Parcial (4).
69 70 LEU-VAL	Nula (2 y 3), Parcial (4).
73 74 LEU-ARG	Parcial (2 y 4), Nula (3).

Tabla 12: Grado de hidrólisis por quimotripsina de las ubiquitinas secuenciadas.

- (1) Ub de timo de ternera (Schlesinger *et al.*, 1.975)
- (2) Ub de testículo de trucha (Watson *et al.*, 1.978).
- (3) Ub de timo de ternera (Low *et al.*, 1.979).
- (4) Ub de *Ceratitidis capitata*.

pero la homología que se puede observar es aún mayor. En la figura 30 se recogen las nuevas homologías ahora propuestas, y en la figura 31 se muestra la secuencia completa de la proteína, en la que se asignan a los fragmentos homólogos letras con las que es-

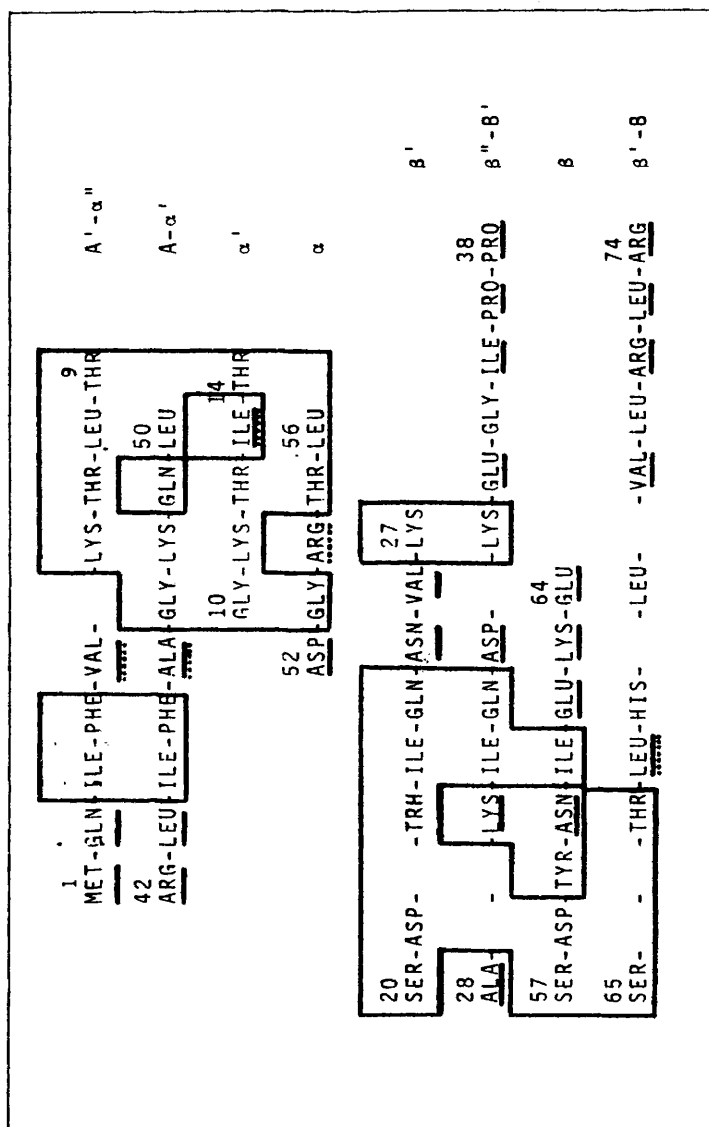


FIGURA 30: Homología interna de la ubiquitina de

Cenatitia capitata.

En recuadro, aminoácidos invariables.

Subrayados, aminoácidos que proceden del cambio de una sola base en el triplete original. En línea de puntos, aminoácidos conservativos.

1	4	5	9	10	14	15	19	20																															
MET	GLN	ILE	PHE	VAL	LYS	THR	LEU	THR	GLY	LYS	THR	ILE	THR	LEU	GLU	VAL	GLU	PRO	SER																				
<hr/>																																							
A'		α''		α'		C																																	
<hr/>																																							
ASP		THR		ILE		GLU		ASN		VAL		LYS		ALA		LYS		ILE		GLN		ASP		LYS		GLU		GLY		ILE		PRO		PRO		ASP		GLN	
<hr/>																																							
B'		β''		B'		D																																	
<hr/>																																							
41		42		45		46		50		51		52		56		57																							
GLN		ARG		LEU		ILE		PHE		ALA		GLY		LYS		GLN		LEU		GLU		ASP		GLY		ARG		THR		LEU		SER		ASP		TYR		ASN	
<hr/>																																							
A		α'		α		B																																	
<hr/>																																							
64		65		69		70		74																															
ILE		GLN		LYS		GLU		SER		THR		LEU		HIS		LEU		VAL		LEU		ARG		LEU		ARG													
<hr/>																																							
β'		B																																					

FIGURA 31: Codificación génica de la ubiquitina.

quematzaremos el proceso evolutivo que ha podido seguir un gen ancestral para originar el gen de la ubiquitina.

Los fragmentos α (residuos 52 a 56), α' (residuos 46 a 50 y 10 a 14) y α'' (residuos 5 a 9) son homólogos entre sí. Otro tanto ocurre con los fragmentos β (residuos 57-64), β' (residuos 65 a 69 y 20-27) y β'' (residuos 28 a 33) y las secuencias A (residuos 42 a 45) y A' (residuos 1 a 4). Por último el fragmento B (residuos 70 a 74) y el B' (residuos 34 a 38) deben proceder de una codificación génica idéntica en un principio.

Unicamente las secuencias C (residuos 15 a 19), y D (residuos 39 a 41) y el ácido glutámico (residuo 51) no parecen tener homología con algún otro fragmento de la ubiquitina.

La ubiquitina está codificada por un gen formado por dos fragmentos casi idénticos entre sí:

A' $\alpha''\alpha'C\beta'\beta''B'$ (residuos 1 a 38) y
D A $\alpha'\alpha\beta\beta'B'$ (residuos 39 a 74).

Los apóstrofes indican, en el mecanismo de evolución (1) que se propondrá más adelante, el orden evolutivo de cada fragmento. Así, el fragmento A' procede del A y los α' del α ...

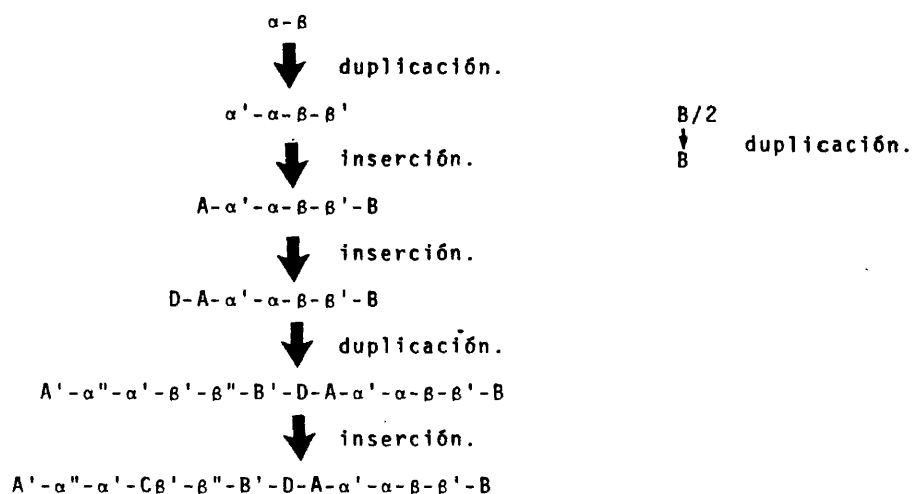
Se puede observar que en cada uno de estos fragmentos existen cuatro secuencias homólogas entre sí dos a dos (α'' con α' y β' con β'' , α' con α y β con β').

Se pueden proponer dos esquemas que muestran el desarrollo evolutivo del gen ubiquitina a lo largo del tiempo.

Mecanismo 1.

El gen que codifica la ubiquitina (gen Ub) procedería del gen ancestral que codifica la secuencia 52 a 64 (gen α - β). En una

Mecanismo 1.



Mecanismo 2.

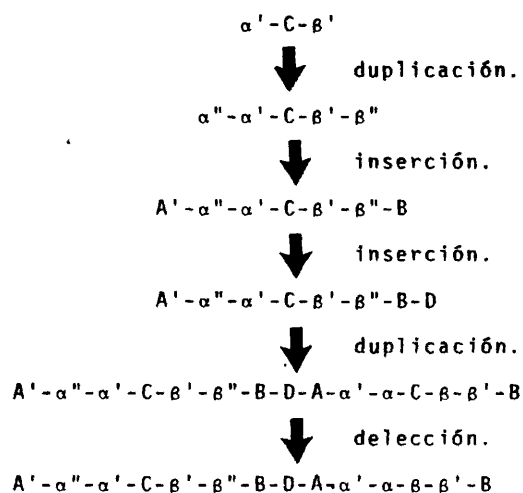


FIGURA 32: Esquema de dos posibles caminos evolutivos que dieron lugar a la aparición del gen que codifica a la ubiquitina.

primera etapa cada uno de los genes α y β se duplicaría, formando el gen $\alpha'-\alpha-\beta-\beta'$. Por inserción de los genes A y B aparecería el nuevo gen $A-\alpha'-\alpha-\beta-\beta'-B$. El gen B que codifica la secuencia Leu-Arg-Leu-Arg podría proceder de un gen B/2 que codificaría la secuencia ⁷¹ ⁷² Leu-Arg y por duplicación originaría el gen antes mencionado (B).

Una nueva duplicación originaría el gen $A'-\alpha''-\alpha'-\beta'-\beta''-B-A-\alpha'-\alpha-\beta-\beta'-B$. Las inserciones de los genes D y C, que podrían tener lugar como se muestra en la figura 32, darían lugar al gen Ub.

Mecanismo 2.

El gen ancestral sería, en este caso, el que codifica la secuencia 10-27 (gen $\alpha'-C-\beta'$). El mecanismo que se recoge en la figura 32, comprendería dos duplicaciones, dos inserciones y una delección. En este caso el fragmento 71-74 (codificado por el gen B) no procedería de la duplicación del gen B/2, ya que se formaría por duplicación de B en el paso $A'-\alpha''-\alpha'-C-B-\beta'-\beta''-B-D$ $A'-\alpha''-\alpha'-C-\beta'-\beta''-B-D-A-\alpha'-\alpha-C-\beta-\beta'-B$.

Es de destacar que la secuencia 52-64 codificada por $\alpha-\beta$, está relacionada con el péptido sintetizado por Schlesinger *et al.*, (1.978). Este péptido posee el 40% de actividad biológica descrita para la ubiquitina. Este péptido podría ser el causante de la acción diferenciadora que la ubiquitina ejerce sobre las células T y B, y ser esta actividad un residuo funcional, pero no su funcionalidad habitual.

Es posible que el péptido 52-64 exista en forma libre y tenga acción sobre los receptores β -adrenérgicos de la superficie celular, o que, a lo largo del proceso evolutivo haya desaparecido,

siendo sustituida su acción por otros componentes biológicos más potentes.

Conservatividad. Velocidad de evolución.

Se han elucidado las estructuras primarias de ubiquitina humana, bovina y de trucha. En los tres casos la estructura es idéntica, presentándose una posible alteración en la ubiquitina de testículo de trucha. En este caso la ordenación del péptido triptico que contiene la histidina no ha sido realizada, y el residuo C-terminal presenta heterogeneidad, apareciendo glicocola y arginina en la misma proporción, aunque el residuo de glicocola no se encuentra sustituyendo a la arginina N-terminal, sino unido a ésta.

El primer estudio realizado sobre ubiquitina de insecto, proporciona una estructura primaria idéntica a la obtenida con la proteína aislada de las especies antes mencionadas. La conservación de la secuencia de una proteína desde un insecto al hombre es un caso único. Las proteínas más conservativas son las histonas, y entre éstas las H3 y H4, con un cambio en 135 residuos y cuatro cambios en 125 residuos respectivamente, entre las histonas de timo de ternera y gallina (Warker *et al.*, 1980). La ubiquitina, por lo tanto, presenta un grado de conservatividad único, no produciéndose cambio alguno en la secuencia de especies tan alejadas en la evolución, como el hombre y el díptero *Ceratitis capitata*. Este hecho apoya las teorías de todos los autores que trabajan en este tema, de que la ubiquitina es una proteína cuya función biológica debe ser vital para las células, y su estructura terciaria imprescindible para el desarrollo de dicha función.

Péptidos contaminantes.

Se han aislado 5 péptidos que interaccionan con la ubiquitina, y se ha detectado otra fracción de bajo peso molecular en la que existe un componente prioritario que es triptófano. La composición de estos péptidos y la determinación de su peso molecular, nos permiten deducir que están formados por 20-40 aminoácidos.

El hallazgo de estos péptidos confirman la tesis de Low *et al.*, (1.979). Hemos visto que tienen la capacidad de proteger a la ubiquitina del ataque de enzimas proteolíticas (Tabla 7). Si es cierto que la ubiquitina tiene algún tipo de función en un mecanismo proteolítico como por ejemplo la de señalar las proteínas que han de ser degradadas, estos péptidos podrían formar parte del mismo mecanismo, actuando como protectores de la ubiquitina a la acción de proteasas.

La interacción podría ser un artefacto del proceso de extracción, pero de cualquier forma, se pone de manifiesto la capacidad de esta proteína de interaccionar con péptidos básicos.

Sistema de extracción de péptidos a partir de mapas peptídicos.

El nuevo método descrito en este trabajo permite aumentar el rendimiento del proceso de extracción hasta ocho veces los valores que se obtenían por el método usual. De esta forma, se ha podido convertir una técnica, prácticamente analítica en preparativa.

La gran eficacia de separación de la técnica de mapas peptídicos, combinada con el nuevo procedimiento de extracción, permite la purificación de los péptidos que proceden de una hidrólisis enzimática en cantidades suficientes para realizar la secuencia manual, y evitando posteriores purificaciones.

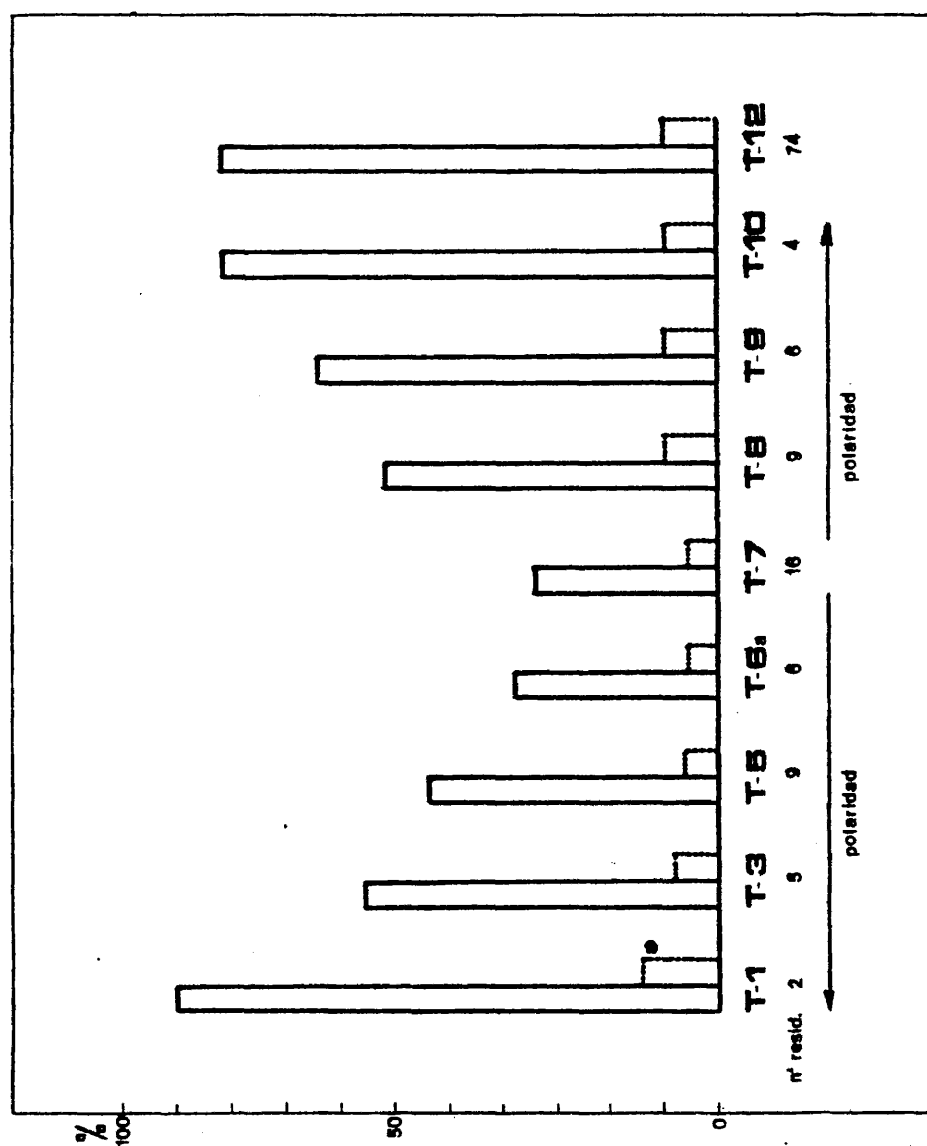


FIGURA 33: Comparación de los rendimientos de extracción de los péptidos tripticos de ubiquitina de *Cexatitús capitata*. — Sonicación ... Agitación.

En la figura 33 se recogen los diferentes rendimientos obtenidos con las dos técnicas, simple agitación y sonicación, comentadas.

En ambos casos puede observarse la influencia del tamaño y polaridad de los péptidos en los rendimientos, siendo éstos óptimos para péptidos pequeño e hidrofílicos.

1406

61

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

- La ubiquitina aislada de huevo del insecto *Ceratitis capitata* se comporta como una única especie molecular en gel de poliacrilamida y gel de poliácridamida en presencia de SDS. El análisis de su residuo N-terminal confirma la homogeneidad de la especie aislada. La composición de aminoácidos de la ubiquitina aislada de diferentes lotes de huevos es constante.

- El rendimiento de la purificación se situa en 10-15 mg por 200 g de huevos.

- La composición de aminoácidos es ASX 7, THR 7, SER 3, GLX 12-13, PRO 3, GLY 5, ALA 2, VAL 4, MET 1, ILE 6-7, LEU 7-8, TYR 1-2, PHE 2-3, HIS 1, LYS 7, ARG 4. No posee cisteína ni triptófano.

- El espectro de dicroísmo pone de manifiesto el bajo contenido en estructuras α y β de esta proteína. Los porcentajes de las mismas varían del 9-20% (hélice α) y del 9-5% (estructura β) dependiendo del ajuste empleado.

- El espectro ultravioleta exhibe un máximo a 275 nm correspondiente a la contribución de la única tirosina, y hombros en la región 255-265 nm, contribución de las dos fenilalaninas de la proteína.

- Se ha determinado la secuencia completa de la proteína (figura 28).

- La secuencia presenta gran homología interna. Se ha propuesto un mecanismo genético que daría origen al gen de la ubiquitina a partir de un gen ancestral.

- Este gen ancestral coincidiría con el que codifica un péptido que parece poseer varias de las actividades biológicas asignadas a la ubiquitina (Schlesinger *et al.*, 1978).

- Se ha aislado un péptido (Gly)₂₋₃, que probablemente interacciona con la ubiquitina y que correspondería al nexo de unión entre Ub y H2A para formar la proteína A24.

- La ubiquitina se ve protegida por péptidos básicos frente a la hidrólisis con enzimas proteolíticas.

- Se ha puesto a punto un nuevo método para la extracción de péptidos y aminoácidos a partir de la celulosa de los mapas peptídicos. Este sistema aumenta en 7-8 veces el rendimiento respecto al método de simple agitación.

14361

12.4

INSTRUMENTACION.

INSTRUMENTACION.

- Espectrofotómetro Varian Techtron modelo 635 D. *Varian*, Melbourne (Australia).
- Espectrofotómetro Cary 118. *Varian*, Melbourne (Australia).
- Registro gráfico REC 61 Servograph. *Radiometer*, Copenhagen (Dinamarca).
- Sonicator Bronson B-230. *Bronson Smithkline Co.*, Shelton. Connecticut (USA).
- Homogenizador de vidrio con émbolo de teflón de 60 ml. *Potter-Elvehjem*.
- Centrífuga Sorvall RC-2B. *Sorvall*, Norwalk. Connecticut (USA).
- Rotor SS-34. *Sorvall*, Norwalk. Connecticut (USA).
- Agitadores Super-Mixer 1291. *Lab-Line Instruments, Inc.*, Melrose Park. Illinois (USA).
- Columnas. *Pharmacia Fine Chemical*, Upsala (Suecia).
- Fotómetro de flujo continuo Uvicord II. *LKB*, Estocolmo, (Suecia).
- pHmetro Radiometer 26. *Radiometer*, Copenhagen, (Dinamarca).
- Liofilizador. *Virtix C. Inc.*, Gardiner. New York (USA).
- Fuente de tensión. *LKB* Modelo 3371D, Estocolmo (Suecia).
- Bomba peristáltica *Pharmacia P-3. Pharmacia Fine Chemical*, Upsala (Suecia).
- Analizador automático *Durrum* modelo D500, Palo Alto. California (USA).
- Computador PDP-8M, *Teletype*.

- Filtro millipore. *Millipore, Bedford. Massachusetts (USA).*
- Cromatógrafo líquido-líquido Waters Ass. 440. *Waters, Milford. Massachusetts (USA).*
- Cromatógrafo gas-líquido 5750-G. *Hewlett-Packard, Palo Alto. California (USA).*
- Colector de fracciones Radi-Rac 3402B. *LKB, Estocolmo (Suecia).*
- Colector de fracciones Gilson TDC 200. *Gilson, Villiers le Bel (Francia).*
- Colector de fracciones Radi-Rac 2112. *LKB, Estocolmo (Suecia).*
- Secuenciador automático. Beckman 890B. *Beckman Instruments, Palo Alto. California (USA).*
- Cámara de electroforesis en capa fina. *Desaga, Heildelberg (R.F. Alemania).*
- Baño de agua. *Gallenkamp, Inglaterra.*
- Lámpara ultravioleta Uraton-70. *Atom, Barcelona (España).*
- Pipetas automáticas. *Oxford Laboratorios, San Mateo. California (USA).*
- Pipetas automáticas. *Gilson, Villiers le Bel (Francia).*

1266

151

PRODUCTOS.

PRODUCTOS.

Material Biológico.

- Huevosde *Ceratitidis capitata*. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. Alcalá de Henares (España).

Determinación de actividad lítica.

- *Micrococcus lysodeikticus*. Sigma Chemical Co., St. Louis. Missouri (USA).

- Fosfato potásico. Merck, Darmstad, (R.F. Alemania).

Valoración de proteínas.

- Folin Ciocalteau, sulfato cúprico. $5H_2O$, carbonato sódico, hidróxido sódico. Merck, Darmstad, (R.F. Alemania).

Aislamiento de la proteína.

- Ácido acético, azida sódica, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, ácido fosfórico, urea, bicarbonato sódico. Merck, Darmstad, (R.F. Alemania).

- Cloránfenicol. Antibióticos S.A., León (España).

- Amberlita CG 50. Mallinckrodt, St. Louis. Missouri, (USA).

- Sephadex G 25 medium, G 75, G 50 medium y fine, y azul de dextrano. Pharmacia Fine Chemicals, Upsala (Suecia).

Criterios de pureza.

- Acrilamida, N, N'-metilen-bisacrilamida. Koch Light Lab. Ltd.,

Colnbrook (Inglaterra).

- Acetona, metanol. *Panreac, Montplet y Esteban S.L.*, Barcelona (España).

- Papel Whatman nº1. *Bolston Ltd*, Maidstone (Inglaterra).

- N, N, N', N'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED). *Miles Lab. Inc.*, Slough (Inglaterra).

- Persulfato amónico, ácido acético, urea sacarosa, TRIS, azul de Coomassie, metabisulfito sódico, fucsina, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético. *Merck*, Darmstad (R.F. Alemania).

- Lauryl sulfato sódico (SDS). *Sigma Chemical Co.*, St. Louis Missouri (USA).

- Negro amido. *Fluka A.G.*, Buchs (Suiza).

- Azul de bromofenol. *Carlo Erba*, Milán (Italia).

Composición de aminoácidos.

- Acido clorhídrico, fenol, hidróxido sódico, citrato sódico. $2H_2O$, tiodiglicol, EDTA. *Merck*, Darmstad (R.F. Alemania).

- Reactivo de ninhidrina, ácido metanosulfónico, triptamina, ácido mercaptoacético. *Pierce Chemical*, Rockford. Illinois (USA).

Secuencia automática.

- Isotiocianato de fenilo en heptano, Quadrol, ácido n-heptafluorbutírico, benceno, acetato de etilo, cloruro de n-butilo. *Beckman*, Palo Alto. California (USA).

- Acido clorhídrico, fosfato disódico, cloroformo, 1-propanol, 2-propanol, heptano, ácido propiónico, tolueno, cloruro de estaño, n-pentano, ácido acético. *Merck*, Darmstad (R.F. Alemania).

- Feniltiohidantoin derivados (PTH-aa). *Sigma Chemical Co.*, St. Louis. Missouri (USA).
- Bis-trimetil-silil-acetamida. *Aldrich-Europa*, Beerse (Bélgica).
- Metanol. *Panreac*. Montplet y Esteban S.L. Barcelona (España).
- Dicloroetano. *Carlo Erba*, Milan (Italia).
- Butil-PBD. *Eastman Organic, Chem.*, Rochester. New York (USA).
- Placas de silica gel 20x20 cm. *Merck.*, Darmstad (R.F. Alemania).
- Placas de poliamida. *Cheng-Chin Tradin Co.*, Taipei (Taiwan).

Hidrólisis enzimática.

- Tripsina, quimotripsina, clostripaina. *Worthington Biochem Co.*, Freehold. New Jersey (USA).
- TPCK, TLCK, β -mercaptoetanol. *Sigma Chemical Co.*, St. Louis. Missouri (USA).
- N-metil-morfolina. *Aldrich-Europa*, Beerse (Bélgica).
- Fosfato sódico. *Merck*, Darmstad (R.F. Alemania).

Reactivos específicos.

- Ninhidrina. *Sigma Chemical Co.*, St. Louis. Missouri (USA).
- Colidina, ácido acético, α -nitroso- β -naftol, ácido nítrico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico. *Merck*, Darmstad (R.F. Alemania).
- Etanol (destilado), ácido sulfanílico. *Panreac*, Montplet y

esteban S.L., Barcelona (España).

- Fluorescamina. *Serva Fein Biochemical*, Heildelberg (R.F. Alemania).

- Trietilamina. *Carlo Erba*, Milan (Italia).

- Fenantrenoquinona. *F.E.R.O.S.A.*, Barcelona (España).

- α -Naftol, nitrito sódico. *T. Schuchardt*, München (R.F. Alemania).

- p-Dimetilaminobenzaldeido. *Pierce Chemicals*, Rockford. Illinois (USA).

Separación de péptidos.

- Piridina. *Carlo Erba*, Milan (Italia).

- Acido acético, n-butanol. *Merck*, Darmstad (R.F. Alemania).

- Acetona (destilada). *Panreac*, Montplet y *Esteban S.L.*, Barcelona (España).

- Placas de celulosa C.F. Polygram CEL 300, 20x20 cm, 0,1 mm de espesor. *Macherey Nagel & Co.*, Düren (R.F. Alemania).

- Dansil-derivados (DNS). *Sigma Chemical Co.*, St. Louis. Missouri (USA).

Degradación manual.

- Fenilesotiocianato. *Beckman Instruments Inc.*, Palo Alto. California (USA).

- Piridina, ácido fórmico, dicloroetano. *Carlo Erba*, Milan (Italia).

- Acido trifluoroacético, acetato de n-butilo, agua oxigenada, tolueno, fosfato sódico, amoniaco, placas de silica gel 20x20 cm. *Merck*, Darmstad (R.F. Alemania).

- Cloruro de dansilo, dansil-derivados. *Sigma Chemical Co.*, St. Louis. Missouri (USA).

- N-etil-morfolina. *Aldrich-Europa*, Beerse (Bélgica).

- Dimetilformamida. *Fluka AG*, Buchs (Suiza).

153

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Acher O.K., y Pierce J.C. (1.961) *Fed. Proc.* 20, 26.
- 2.- Andersen M.W., Ballal N.R., Goldknopf I.L., Wilson G. Busch H.
J. Cell Biol. 87, 410.
- 3.- Andersen M.W., Ballal N.R., Goldknopf I.L. y Busch H. (1.981)
Biochemistry 20, 1.100-1.104,
- 4.- Bach J.F., Dardenne M., Pleau J.M. y Rosa J. (1.977) *Nature*
266, 55-57.
- 5.- Bach J.F., Dardenne M., Pleau J.M. y Man (1.977b) *J. Biol Chem.*
252, 8.040-8.044.
- 6.- Bach J.F., Pleau J.M., Dardenne M. y Blouquit Y. (1.977c) *J.*
Biol. Chem. 252, 8.045-8.047.
- 7.- Ballal N.R., Goldknopf I.L., Goldberg D.A. y Busch H. (1.974).
Life Sci. 14, 1.835-45.
- 8.- Ballal N.R., Kang Y.J., Olson M.O.J. y Busch H. (1.975) *J. Biol.*
Chem. 250, 5921-25.
- 9.- Beaven G.H. y Holiday E.R. (1.952) *Adv. Protein Chem.* 7, 319-
382.
- 10.- Bencze W.L. y Schmid, K. (1.957) *Anal. Chem.* 29, 1193.
- 11.- Bolotina I.A., Chekhov V.O., Lugauskas V.Y., Finkel'shtein A.V.
y Ptitsyn O.B. (1.980) *Molekulyarnaya Biologiya* 14, (4) 891-
901.
- 12.- Cary P.D., King D.S., Crane-Robinson C., Bradbury E.M., Rabbani
A., Goodwin G.H. y Johns E.W. (1.980) *Eur J. Biochem* 112, 577-
580.
- 13.- Ciechanover A., Elias S., Heller H., Ferber S. y Hershko A.
(1.980) *J. Biol Chem.* 255 (16) 7.225-7228.

- 14.- Chen, Yang y Martinez (1.972) *Biochemistry* 11 (22) 4120-4131.
- 15.- Chen R. (1.976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 873.
- 16.- Chou P.Y. y Fasman G.D. (1.974) *Biochemistry* 13, 211-222.
- 17.- Cook W.J., Suddath F.L., Bugs C.E. y Goldstein G. (1.979) *J. Mol. Biol.* 130, 353-355.
- 18.- Dayhoff M.O. (1.972) *Atlas of Prot. Seq. and Struc.*, pags. 89-99, *Nat. Biomed. Res. Fund. Washington D.C.*
- 19.- Dayhoff M.O. (1.976) *Atlas of Prot. Seq. and Struc. Vol 5 Supp* 12, *Nat Biomed. Res. Fund. Washington D.C.*
- 20.- Delange R.J., Fambrough D.M., Smith E.K. y Bonner J. (1.969), *J. Biol. Chem.* 244, 5.669.
- 21.- Perez-Aranda A., (1.973), *Tesis Doctoral.*
- 22.- Dognin M.J. (1.978) *Tesis doctoral.*
- 23.- Edelhoch H. (1.967) *Biochemistry* 6, 1.948-1,954.
- 24.- Edman P. (1.949) *Acta. Chem. Scam.* 4, 283.
- 25.- Fernández-Sousa J.M., Municio A.M. y Ribera A. (1.971) *Biochim. Biophys Acta* 231, 527-534.
- 26.- Fernández-Sousa J.M., Gavilanes J.G., Municio A.M., Pérez-Aranda A. y Rodríguez R. (1.977) *European J. Biochem.* 72, 25-33.
- 27.- Folkers D. y Wan Y.P. (1.978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 740-744.
- 28.- Gray, W.R. y Hartley, B.S. (1.963) *Biochem. J.* 89, 379.
- 29.- Goldknopf I.L. y Busch H. (1.975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 951-960.
- 30.- Goldknopf I.L. y Busch H. (1.977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 864-868.

- 31.- Goldknopf I.L., French M.F., Daskal Y. M. y Busch H. (1.978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84 (3), 786-793.
- 32.- Goldknopf I.L., Rosenbaum F., Sterner R., Vidali G. Allfrey
V.G. y Busch H. (1.979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90
(1), 269-277.
- 33.- Goldknopf I.L., Wilson G., Ballal N.R. y Busch H. (1.980) *J.*
Biol. Chem. 255 (22), 10.555-10.558.
- 34.- Goldknopf I.L., Sudhakar S., Rosenbaum F. y Busch H. (1.980)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 95 (3), 1.253-1.260.
- 35.- Goldstein G. (1.974) *Nature* 247, 11.
- 36.- Hamilton J.W. y Rouse J.B. (1.980) *Biochem. Biophys. Res. Co-*
mmun. 96 (1), 114-120.
- 37.- Hammerling U., Chin A.F., Abbo H.J., Goldstein G., Sonnenberg
M. y Hoffman M.D. (1.976) *Eur. J. Immunol.* 6, 88.
- 38.- Hartley, B.S. (1.970) *Biochem J.* 119, 805.
- 39.- Horning E.C., Van der Hevel, N.J.A. y Greech, B.G. *Methods*
Biochem. Anal. 11, (1.963) 69.
- 40.- Hunt L.T., Dayhoff M.O. (1.977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
74 (2), 650-655.
- 41.- Iwata T., Incefy G.S., Good R.A. (1.979) *Biochem Biophys. Res.*
Commun. 88 (4), 1.419-1.427.
- 42.- Jenson J., Goldstein G. y Berslow E. (1.980) *Biochim. Biophys.*
Acta 624, 378-385.
- 43.- Kagan W.A., O'Neil G.J., Incefy G.S., Goldstein G. y Good R.A.
(1.977) *Blood* 50 (2), 276-288.
- 44.- Kagan W.A., Siegal F.P., Gupta S., Goldstein G. y Good R.A.
(1.979) *J. Immunol.* 122 (2) 686-691.
- 45.- Lai (1.977) *Methods in Enzimol. Vol XLVII*, pags. 369-373.

- 46.- Lenkinski R.E., Chen D.M., Glickson J.D. y Goldstein G.
(1.977) *Biochim. Biophys. Acta.* 494, 126-130.
- 47.- Low T.L.K. y Goldstein A.L. (1.979) *J. Biol. Chem.* 254 (3),
987-995.
- 48.- Low T.L.K., Thurman G.B., Mc Adoo M., Mc Clure J., Rossio J.L.
Naylor P.H. y Goldstein A.L. *J. Biol. Chem.* 254 (3) 981-986.
- 49.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1.951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 50.- Mann T. y Leone E. (1.953) *Biochem J.* 53, 140.
- 51.- Martinez D., Fieldk, Schwam H., Tytell A.A. y Hillerman M.R.
(1.978) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159, 195-200.
- 52.- Matsui S., Seon B.K. y Sandberg A.A. (1.979) *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA* 76 (12), 6.286-90.
- 53.- Méndez E. y Lai C.Y. (1.975) *Anal. Biochem.* 65, 281.
- 54.- Miller J.F.A.P. (1.961) *Lancet* 2, 748-749.
- 55.- Mitchell W.M. (1.971b) *Methods in Enzimol*, pag. 165-170.
- 56.- Mitchell W.M. y Porter W.H. y Cunningham L.W. *J. Biol. Chem.*
246 (18), 7675.
- 57.- Moore A.T. (1.972) in: *Chemistry and Biology of Peptides* (ed.
J. Meienhofer), pag. 629, Ann Arbor Science Publishers.
- 58.- Naylor P.H., Camp C.E., Phillips A.C., Thurman G.B. y Golds-
tein A.L. (1.978) *J. Immunol. Methods* 20, 143-153.
- 59.- Panyim S. y Chalkley R. (1.969). *Arch Biochem. Biophys.* 130,
337-346.
- 60.- Pisano J.J., Bronzert T.J. y Brower H.B. (1.972) *Anal Biochem.*
45, 43.
- 61.- Sahaguchi S. (1.925). *J. Biochem (Tokyo)* 5, 25.
- 62.- Segrest J.P. (1.972) *Methods in Enzymol. Vol. XXVIII*, 54-63.

- 63.- Seidah N.G., Crine P., Benjannet, Scherrer H. y Chrétien M.
(1.978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (3), 600-608.
- 64.- Scheid M.P., Goldstein G., Hammerling U. y Boyse E.A. (1.974)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 531.
- 65.- Scherrer H., Seidah N.G., Benjannet S., Crine P., Lis M. y
Chrétien M. (1.978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84 (4),
874-885.
- 66.- Schlesinger D.H., Goldstein G. y Nial H.G. (1.975) *Biochemis-*
try 14 (10), 2.214.
- 67.- Schlesinger D.H. y Goldstein G. (1.975) *Nature* 255, 423-424.
- 68.- Schlesinger D.H., Goldstein G., Scheid M.P. y Bitensky M.
(1.978) *Experientia* 34 (6), 703-704.
- 69.- Summers M.R., Smyters G.W. y Oroxslaw S. (1.973) *Anal Biochem.*
53, 624.
- 70.- Vanderkerkhore J. y Van Montagu M. (1.974) *Eur. J. Biochem.* 44,
279.
- 71.- Walker J.H., Goodwin G.H. y Johns E.W. (1.978) *FEBS Lett.* 90
327-330.
- 72.- Walker J.M. y Johns E.W. (1.980) *Biochem. J.* 185, 383-386.
- 73.- Walsh K.A. (1.970) *Methods in Enzymol. Vol. XIX*, 41-63.
- 74.- Watson D.C., Levy B.W. y Dixon G.H. (1.978) *Nature* 276 (9),
196-198.
- 75.- West M.H.P. y Bonner N.M. (1.980) *Nucleic/Acids Research.* 8
(20), 4.671-4.680.
- 76.- White, Moss, Osserman y Wilson (1.977) *Biochemistry* 16 (7).
- 77.- Wilcox K.A. (1.970) *Methods in Enzymol. Vol. XIX*, 64-108.
- 78.- Wittman-Liebold B., Geissler A.W. y Marzinzig E. (1.975) *J.*
Supramol. Struct. 3, 426.

- 79.- Woods K.R. y Wang K.T. (1.967) *Biochim. Biophys. Acta* 144,
369-373.
- 80.- Yamada S. e Itano H.A. (1.966) *Biochim. Biophys. Acta*. 130,
538-542.

